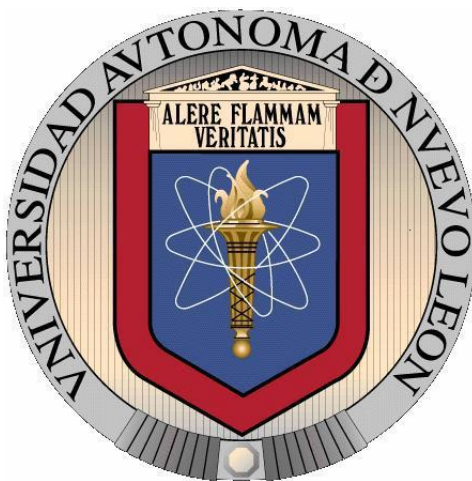


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN  
CRÓNICA DE UNA DOSIS NEUROPROTECTORA DE LA RAPAMICINA  
*IN VIVO***

**PRESENTA**

**M.C.P. ALFREDO GONZÁLEZ ALCOCER**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**JULIO, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN  
CRÓNICA DE UNA DOSIS NEUROPROTECTORA DE LA RAPAMICINA  
*IN VIVO***

**PRESENTA**

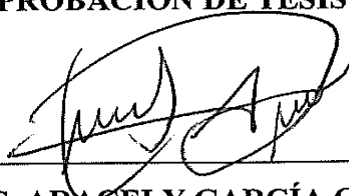
**M.C.P. ALFREDO GONZÁLEZ ALCOCER**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**JULIO, 2018**

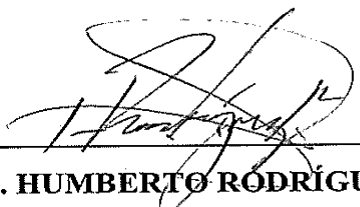
**ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL EFECTO DE LA  
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UNA DOSIS  
NEUROPROTECTORA DE LA RAPAMICINA *IN VIVO***

**APROBACIÓN DE TESIS**



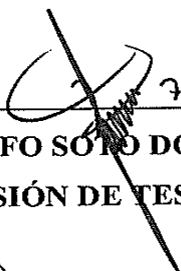
---

**DRA. en C. ARACELY GARCÍA GARCÍA**  
**DIRECTOR**



---

**DR. en C. HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA**  
**CO-DIRECTOR**



---

**DR. en C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ**  
**COMISIÓN DE TESIS**



---

**DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**  
**SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

# **ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UNA DOSIS NEUROPROTECTORA DE LA RAPAMICINA *IN VIVO***

Presentado por:

M.C.P. Alfredo González Alcocer

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, del  
Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma  
de Nuevo León, bajo la dirección de la DRA. en C. Aracely García García y la co-  
dirección del DR. en C. Humberto Rodríguez Rocha.**

One, remember to look up at the stars and not down at your feet. Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.

**Stephen Hawking (1942 – 2018)**

## **Agradecimientos**

A mis padres, por ser los que me dieron las herramientas y las oportunidades, para lograr metas nuevas en mi vida.

A mis hermanos, Jessica y Diego, que fueron motor de mi día a día, aún en la distancia, siempre estuvieron en mi mente y en mi corazón.

A la Dra. Aracely, por darme la oportunidad de ser su estudiante, por aprender de ella y por tanta paciencia.

Al Dr. Humberto, por enseñarme a ver las cosas de otra manera, su peculiar manera de enseñar me ha dejado en tan poco tiempo, grandes enseñanzas.

Al Dr. Adolfo, por enseñarme desde un principio a trabajar en el laboratorio, por sus consejos y su valiosa aportación en mi formación académica.

Al Dr. Roberto Montes, por darme la oportunidad desde el servicio social de integrarme al departamento de histología.

A mis compañeros del Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, Yareth, Dany T., Dany M., por su apoyo incondicional, que sin ustedes esto no habría sido posible.

A mis amigos de Mérida, por siempre estar al alcance de una llamada o un mensaje, para darme sus consejos cuando más lo necesité.

A mi mejor amigo, Neri, gracias por el apoyo y el consejo, que siempre obtuve de ti.

A mi novia, Ilse, por darme esa energía extra en los momentos que más lo necesité.

A las personas que ya no están en mi vida, que dejaron una huella en mí para cumplir esta meta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de maestría.

Dios, gracias por tanto.

## Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
®	Marca registrada
ATG	Gen relacionado a la autofagia
Cu	Cobre
DAB	3,3'-Diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidina-2fenilindol
dH <sub>2</sub> O	Agua destilada
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
EPA	Estructura pre-autofagosoma
Fig	Figura
G	Gauge (caliber)
Hg	Mercurio
HyE	Hematoxilina y eosina
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IP	Intraperitoneal
mA	Miliamperios
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mTOR	Receptor blanco de rapamicina en célula de mamífero
mTORC1	Complejo 1 del receptor blanco de rapamicina en célula de mamífero
mTORC2	Complejo 2 del receptor blanco de rapamicina en célula de mamífero
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

$\mu\text{m}^2$	Micrómetros cuadrados
mg/kg	Miligramos/kilogramo
mg/ml	Miligramos/mililitros
PALS	Vaina linfática periarterial
PBS	Buffer de fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PH	Potencial de hidrógeno
RIPA	Buffer de ensayo de inmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
TOR	Receptor blanco de rapamicina
UI	Unidades de insulina
URF	Unidades relativas de fluorescencia
Zn	Zinc



## Lista de Figuras

**Fig. 1 La vía de la autofagia.**

**Fig. 2 mTORC1, es el gran regulador del metabolismo.**

**Fig. 3 mTORC2 tiene una relación directa con la vía de la insulina.**

**Fig. 4 La rapamicina no altera el peso corporal.**

**Fig. 5 Alteraciones histológicas inducidas por la rapamicina en hígado.**

**Fig. 6 La rapamicina no induce incremento de fibras de colágena en hígado.**

**Fig. 7 La rapamicina no altera la histología del riñón.**

**Fig. 8 La rapamicina no induce fibrosis renal.**

**Fig. 9 La rapamicina causa dilatación de los capilares que se encuentran en el islote de Langerhans.**

**Fig. 10 La rapamicina causa alteraciones en la distribución de las fibras de colágeno que conforman los tabiques pancreáticos.**

**Fig. 11 La rapamicina altera la organización celular del islote de Langerhans.**

**Fig. 12 La rapamicina altera la distribución las células-alfa del islote de Langerhans.**

**Fig. 13 La rapamicina no altera la histología del bazo.**

**Fig. 14 La rapamicina no altera la distribución las fibras de colágeno en el bazo.**

**Fig. 15 La rapamicina no altera la población de linfocitos T residentes del bazo.**

**Fig. 16 La rapamicina no altera la población de linfocitos B CD20+ del bazo.**

**Fig. 17 La rapamicina no altera la población de macrófagos CD68+ residentes del bazo.**

**Fig. 18 La rapamicina induce la vía de la autofagia en hígado.**

**Fig. 19 La rapamicina induce la vía de la autofagia en páncreas.**

## Lista de Tablas

**Tabla 1.** Efectos de la rapamicina en modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson.

**Tabla 2.** Efectos de la rapamicina y sus análogos en modelos *in vivo* de la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer.

**Tabla 3.** Efectos de la rapamicina y sus análogos en modelos *in vivo* de diversas enfermedades neurodegenerativas.

## Contenido temático

<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de Tablas.....</b>	<b>IX</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1 La vejez y las enfermedades neurodegenerativas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2 El papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3 mTOR, el gran conducTOR del metabolismo celular.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.4 La rapamicina como agente inmunosupresor.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.5 La función neuroprotectora de la rapamicina mediante la inducción de la autofagia y la inhibición de mTOR.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Objetivo General.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Objetivos Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>2.1 Materiales y Métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.1 Modelo animal.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2 Evaluación del peso corporal.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3 Técnica histológica, tinción con Hematoxilina y Eosina (HyE).....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.4 Tinción Tricrómico Mallory-Azán.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.5 Inmunohistoquímica.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.5.1 Morfometría de los resultados obtenidos por técnica de inmunohistoquímica.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.6 Inmunofluorescencia.....</b>	<b>24</b>

2.1.6.1 Morfometría de los resultados obtenidos por técnica de inmunofluorescencia.....	25
2.1.7 Extracción de proteínas.....	25
2.1.8 Electroforesis.....	26
2.1.9 Transferencia en cámara semi-húmeda.....	26
2.1.10 Western Blot.....	27
2.1.11 Análisis estadístico.....	27
<b>Capítulo 3</b>	
<b>31. Resultados.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Análisis morfológico de órganos blanco en respuesta a la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> .....	30
3.1.1.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> causa cambios morfológicos en hígado .....	30
3.1.1.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> no afecta la morfología del riñón .....	33
3.1.1.3 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> causa cambios morfológicos en páncreas.....	36
3.1.1.4 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> no causa cambios morfológicos en bazo.....	42
3.1.2 Evaluación del posible efecto inmunosupresor de la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> .....	45
3.1.2.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> no altera la población de linfocitos T CD3+, citotóxicos CD8+, ni cooperadores CD4+ en bazo.....	45
3.1.2.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> no modifica la población de linfocitos B CD20+ en bazo.....	48
3.1.2.3 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> no afecta la población de células presentadoras de antígenos: macrófagos CD68+.....	50
3.1.3 Determinación del efecto neuroprotector de la rapamicina sobre la vía de la autofagia en un modelo <i>in vivo</i> .....	52

3.1.3.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> altera la vía de la autofagia en hígado.....	52
3.1.3.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina <i>in vivo</i> altera la vía de la autofagia en páncreas.....	54
Capítulo 4	
Discusión.....	56
Capítulo 5	
Conclusiones.....	61
Literatura Citada.....	62

## Resumen

**M.C.P. Alfredo González Alcocer**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**

**Fecha de Graduación:** Julio 2018

**Título del Estudio: “ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UNA DOSIS NEUROPROTECTORA DE LA RAPAMICINA *IN VIVO*”**

**Número de páginas:** 72

**Área de Estudio:** Morfología

**Candidato para el grado de Maestría  
 en Ciencias con Orientación en Morfología**

### **Propósito y Método de Estudio:**

La vejez representa un problema de salud pública, ya que existe una relación directa entre el envejecimiento y la aparición de cambios a nivel celular que reducen la capacidad funcional del organismo y aumentan la aparición de enfermedades neurodegenerativas.

Entre estos cambios se encuentra la acumulación de proteínas intracelulares, la cual está relacionada con la alteración de las vías de degradación de proteínas, en particular, la autofagia. La autofagia es un mecanismo primordial para la homeostasis neuronal, abundante evidencia ha demostrado que su alteración tiene una relación directa con el incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP).

Uno de los inductores de autofagia mejor caracterizados es la rapamicina. Estudios previos, en un modelo *in vivo* de la EP demostraron el efecto neuroprotector de la rapamicina al lograr disminuir la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

Sin embargo, inicialmente, se utilizó la rapamicina por sus propiedades como agente inmunosupresor, al ser capaz de inhibir la proliferación de células T, B y células presentadoras de antígenos. Asimismo, la rapamicina ha sido relacionada con efectos adversos sobre la vía de la insulina, específicamente sobre las células-beta.

Por lo tanto, es de gran importancia determinar si la dosis de rapamicina que ejerce un efecto neuroprotector, que es 50 veces menor a la utilizada como agente inmunosupresor, tiene un efecto adverso sobre órganos blanco.

### **Conclusiones y Contribuciones**

Determinamos, mediante técnicas de histoquímica, que la administración de una dosis neuroprotectora de la rapamicina *in vivo* causa alteraciones histológicas en hígado y páncreas, en donde demostramos la activación de la autofagia por la rapamicina mediante western blot (WB). Sin embargo, encontramos que no hay modificación en las distintas poblaciones celulares del sistema inmune residentes del bazo a través de técnicas de inmunodetección. Por lo tanto, podemos concluir que la rapamicina, es un gran candidato como agente neuroprotector, contra enfermedades neurodegenerativas como la EP.

---

**Director: Dra. Aracely García García**

## Abstract

Senescence represents a public health problem, since there is a direct relationship between aging and the appearance of changes at the cellular level that reduce the functional capacity of the organism and increase the appearance of neurodegenerative diseases.

Among these changes is the accumulation of intracellular proteins, which is related to the alteration of protein degradation pathways, in particular, autophagy. Autophagy is a primordial mechanism for neuronal homeostasis; abundant evidence has shown that its alteration has a direct relationship with the increase in the incidence of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD). One of the best-characterized autophagy inducers is rapamycin. Previous studies, in an *in vivo* model of PD, demonstrated the neuroprotective effect of rapamycin by decreasing the death of dopaminergic neurons. However, initially, rapamycin was used for its properties as an immunosuppressive agent, being able to inhibit the proliferation of T cells, B cells and antigen presenting cells. Likewise, rapamycin has been linked to adverse effects on the insulin pathway, specifically on beta-cells. Therefore, it is of great importance to determine whether the dose that exerts a neuroprotective effect, which is 50 times less than that used as an immunosuppressant agent, has an adverse effect on the target organs. We determined, by histochemical methods, that the administration of a neuroprotective dose of rapamycin *in vivo* causes histological alterations in the liver and pancreas, where we demonstrated autophagy activation by rapamycin, through western blot (WB). However, none changes were found in the immune system residing cells of the spleen, with immunodetection techniques. We concluded that rapamycin is a great candidate as a neuroprotective agent against neurodegenerative diseases such as PD.

## Introducción

El envejecimiento es un problema de salud pública, ya que el aumento de la tasa de sobrevivencia incrementa la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP). La EP actualmente afecta entre 4.1 y 4.6 millones de personas mayores de 50 años en el mundo. Se calcula que para el año 2030 esta cifra alcanzará de 8.2 a 9.2 millones de personas, lo que conlleva a un grave problema de salud.

Entre los factores relacionados con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas se encuentran el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alteración de la autofagia.

La autofagia es el mecanismo celular que se encarga de degradar los componentes intracelulares que se encuentran dañados o para la obtención de nutrientes en situaciones de escasez, mediante el uso de enzimas hidrolíticas lisosomales. Este mecanismo se basa en una serie de pasos que consisten en: **a)** la formación del fagóforo, **b)** el autofagosoma, y **c)** el autolisosoma, este último mediante la fusión del autofagosoma con el lisosoma para finalmente llevar a cabo la degradación enzimática. Por lo que diversos tratamientos experimentales en modelos animales se han enfocado en la inducción de la autofagia.

Entre los inductores de autofagia, el mejor caracterizado ha sido la rapamicina,. Además, la rapamicina también se utiliza como antifúngico, como co-adyuvante en la terapia anticancerígena, y como agente inmunosupresor.

La activación de la autofagia mediante la rapamicina se debe a su efecto inhibitorio sobre la vía de mTOR, la cual funciona como sensor de los niveles de nutrientes, y promueve la activación de diversos factores de crecimiento. La vía de mTOR inhibe específicamente la autofagia, por lo que al inhibir mTOR se tendrá como resultado la inducción de la autofagia.

Puesto que se ha demostrado un efecto neuroprotector de la rapamicina en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración, y debido a su efecto como inmunosupresor, consideramos de gran importancia el realizar un estudio morfológico



del efecto de la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina *in vivo* para determinar la seguridad de su uso terapéutico.

## Capítulo 1

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 La vejez y las enfermedades neurodegenerativas

La vejez es un proceso del cual ningún ser vivo está exento, usualmente nos referimos a esta etapa como una serie de cambios anatomo-fisiológicos, los cuales dan como resultado la disminución de las capacidades fisiológicas del organismo [1].

Cuando nos referimos al término “envejecer” no necesariamente significa un incremento de la edad, sino que puede referirse a la etapa adulta en la que un organismo comienza a sufrir modificaciones fisiológicas que resultan en la disminución de la homeostasis, y eventualmente desencadenar en la muerte del organismo [2].

Todos los organismos vivos envejecen, éste es un concepto universalmente aceptado, pero la tasa de envejecimiento varía entre individuos e incluso entre grupos. Por ejemplo: en el ser humano, la tasa de envejecimiento está dada por factores genéticos, así como por influencias externas como la alimentación o la exposición al medio ambiente [2].

A nivel celular, el envejecimiento se ha relacionado directamente con la alteración de diferentes mecanismos celulares. Se ha observado que los cromosomas se ven comprometidos debido a un aumento en la degradación de los telómeros, a su vez, el ADN presenta alteraciones en los mecanismos de reparación, y de manera global la célula presenta una disfunción mitocondrial [3]. La disfunción mitocondrial genera a su vez un aumento en los niveles de estrés oxidativo, una disminución en la función mitocondrial, así como una disminución de la actividad de la autofagia [4].

En diversos estudios patológicos se han encontrado niveles significativamente elevados de estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la EP [5].

El origen de estas patologías no solo se debe al aumento de los niveles de estrés oxidativo, sino a un desbalance en los mecanismos antioxidantes que funcionan como sistema de defensa contra el estrés oxidativo. El aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la disminución de los sistemas de defensa de óxido-reducción causan el mal funcionamiento del proteosoma, lo que genera un aumento en la acumulación de proteínas mal plegadas, la activación de la glía y una disfunción mitocondrial que terminará en la muerte celular programada [5].

El envejecer resulta ser la principal causa asociada a un mayor riesgo de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa [6]. Los avances en el campo de la biología molecular han demostrado que los cambios relacionados al envejecimiento son acumulativos, y están íntimamente relacionados con diversas vías, como la vía de la insulina/IGF-1, la vía del receptor de rapamicina/mTOR, la vía de señalización mitocondrial, y la restricción calórica [7].

Estudios recientes han demostrado que la alteración de alguna de estas vías desencadena la aparición y progresión de enfermedades neurodegenerativas como la EP [7].

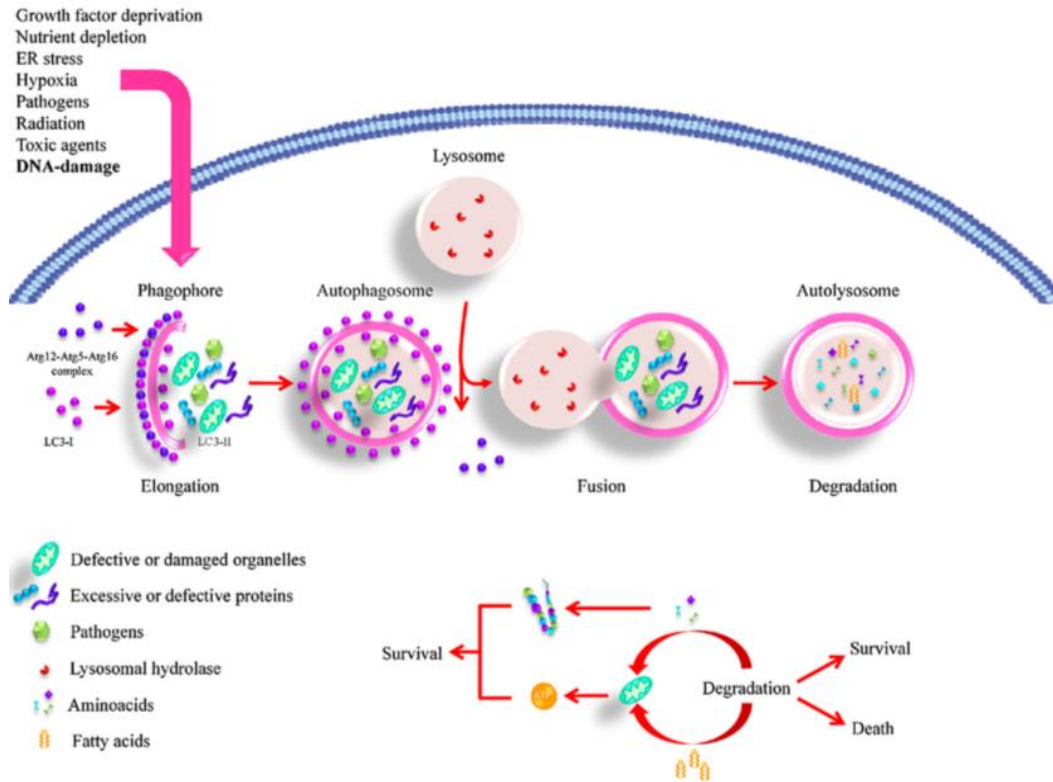
Muchas de las enfermedades neurodegenerativas tienen en común un aumento de la acumulación de proteínas mal plegadas en el sistema nervioso central [8]. El aumento del estrés oxidativo causa el deterioro de los mecanismos de degradación de proteínas, lo cual desencadena la acumulación de péptidos mal plegados como son: el beta-amiloide característico de la EA, alfa-sinucleína presente en la EP, Cu/Zn superóxido dismutasa mutante en la ELA [9], o la huntingtina mutante en la enfermedad de Huntington (EH) [10].

### 1.1.2 El papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas

La autofagia es el mecanismo celular cuyo objetivo es el degradar componentes intracelulares mediante el uso de enzimas hidrolíticas que se encuentran en el interior de los lisosomas [11-16]. Es de gran utilidad para la célula en situaciones de escasez de nutrientes o de estrés celular, desencadenando la formación de una serie de complejos proteicos necesarios para la adaptación celular. Este mecanismo es fundamental no solamente para la obtención de nutrientes sino para la supervivencia celular, por lo que hay una estrecha relación entre la inducción de la autofagia y el crecimiento celular [17]. Estudios recientes han demostrado que la autofagia cumple una función vital en diversos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos, que son bastante complejos.

La autofagia consiste en una serie de pasos que incluyen: el secuestro de los componentes a degradar, el transporte al interior del lisosoma, para la posterior degradación mediante las enzimas hidrolíticas activadas en la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma. Tras la degradación, los componentes generados pueden ser utilizados como fuente de energía para la supervivencia celular [17].

Existen tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. Usualmente, cuando mencionamos a la autofagia nos referimos a la “macroautofagia” [19] (**Fig. 1**).



**Fig. 1. La vía de la autofagia.** La autofagia es inducida por diversos estímulos incluyendo daño de la DNA. La autofagia implica el secuestro de proteínas y organelos celulares dentro de estructuras de doble membrana denominadas autofagosomas, y su degradación subsecuente por la vía lisosomal. Esta vía de degradación inicia con la formación del complejo Atg12-Atg5 y la lipidación de LC3-I a LC3-II, lo cual desencadena el alargamiento del fagóforo. La fusión del autofagosoma y del lisosoma desencadena la acidificación en el ahora autofagolisosoma. En última instancia, la fusión de autofagosoma y lisosoma lleva a: (a) la degradación de los componentes citosólicos con la generación ulterior de aminoácidos y ácidos grasos que se reciclarán para la supervivencia celular; o (b) la eliminación de proteínas y organelos potencialmente dañinos. Bajo ciertas condiciones la autofagia podría inducir la muerte celular para destruir las células deterioradas/dañadas [19].

La autofagia es mediada por un organelo llamado autofagosoma y es considerada como un sistema de degradación no selectiva, esto se debe a que el autofagosoma secuestra una porción de citoplasma celular.

La autofagia funge un papel de gran importancia en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, ya que regula la adaptación celular en situaciones de escasez de nutrientes, la limpieza intracelular, el desarrollo celular, el envejecimiento progresivo, la muerte celular, la supresión tumoral, la supresión genética, y funciona como barrera de defensa contra agentes patógenos. Por lo que cuando la autofagia se ve alterada se pueden generar diversas patologías [20].

En el sistema nervioso, las neuronas hacen uso de la autofagia de manera habitual en procesos como la plasticidad neuronal, la respuesta anti-inflamatoria mediada por la microglía, el desarrollo de los oligodendrocitos, así como en el proceso de mielinización. Por lo que se puede decir que la autofagia tiene un efecto protector en las neuronas [21].

Cuando la autofagia se ve alterada también causa la acumulación de proteínas mal plegadas que desencadenan procesos patológicos que dañan a la neurona [22].

Abundante evidencia ha demostrado que la alteración de la autofagia tiene una relación directa con el incremento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la EH, la ELA y la EP [23].

En años recientes, en el mundo científico, se ha “re-descubierto” el papel de la autofagia y se le ha atribuido tener una estrecha relación con diferentes vías moleculares implicadas en procesos fisiológicos y fisiopatológicos de gran importancia [24-31].

El papel de la autofagia en los mamíferos es ampliamente conocido, aunque los primeros hallazgos se lograron gracias a modelos en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) [15], [24-32].

Se ha encontrado que en las levaduras hay 32 genes relacionados con la autofagia (Atg), y que se han conservado en otras especies incluyendo los mamíferos, dando así una mayor importancia a la función de la autofagia, que ha sido conservada a lo largo de la evolución [24].

Existen numerosos mecanismos involucrados en la regulación de la autofagia como es la proteína mTOR, la cual cumple un papel clave en la regulación del crecimiento y la autofagia. A pesar de los múltiples avances que se han logrado en el estudio de la autofagia, el mecanismo mediante el cual se relaciona con la vía de mTOR aún no está del todo claro [33].

### 1.1.3 mTOR, el gran conducTOR del metabolismo celular

Gracias a la curiosidad de un joven investigador, el Dr. Heitman, fue que pudo ser descubierta la proteína TOR, por sus siglas en inglés “Target Of Rapamacyn”, y otras dos proteínas TOR1 y TOR2. TOR proviene del idioma alemán y significa “puerta”, lo cual es una buena analogía, ya que TOR es la “puerta” para el crecimiento y la proliferación celular [34].

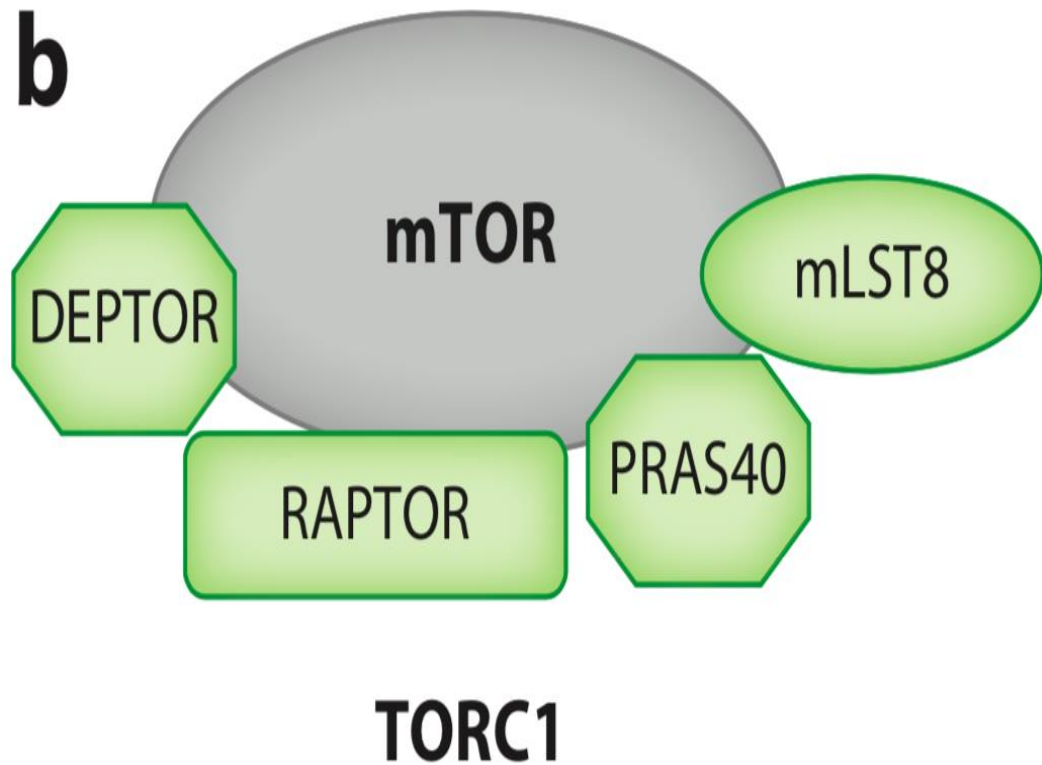
Estudios subsecuentes demostraron mediante la inhibición de TOR con el complejo FKBP12-rapamicina, que TOR es una proteína cinasa localizada en la membrana intracelular que tiene la función de detectar los niveles de nutrientes y llevar a cabo funciones vitales para la célula, como la respuesta inmune. La proteína cinasa TOR se encontró en las células de mamíferos por lo que recibió el término “mTOR” [35].

mTOR es el gran regulador del crecimiento celular y tiene un papel intrínseco en el mecanismo de la autofagia en respuesta a situaciones de escasez de nutrientes, en presencia de factores de crecimiento, así como en situaciones de estrés celular [33].

mTOR es una proteína serina/treonina cinasa que es inhibida por la rapamicina, la cual es un componente producido por una bacteria nativa de la Isla de Pascua e inhibe la proliferación de células eucarióticas [36]. Además, la rapamicina es el inductor de autofagia mejor caracterizado a la fecha.

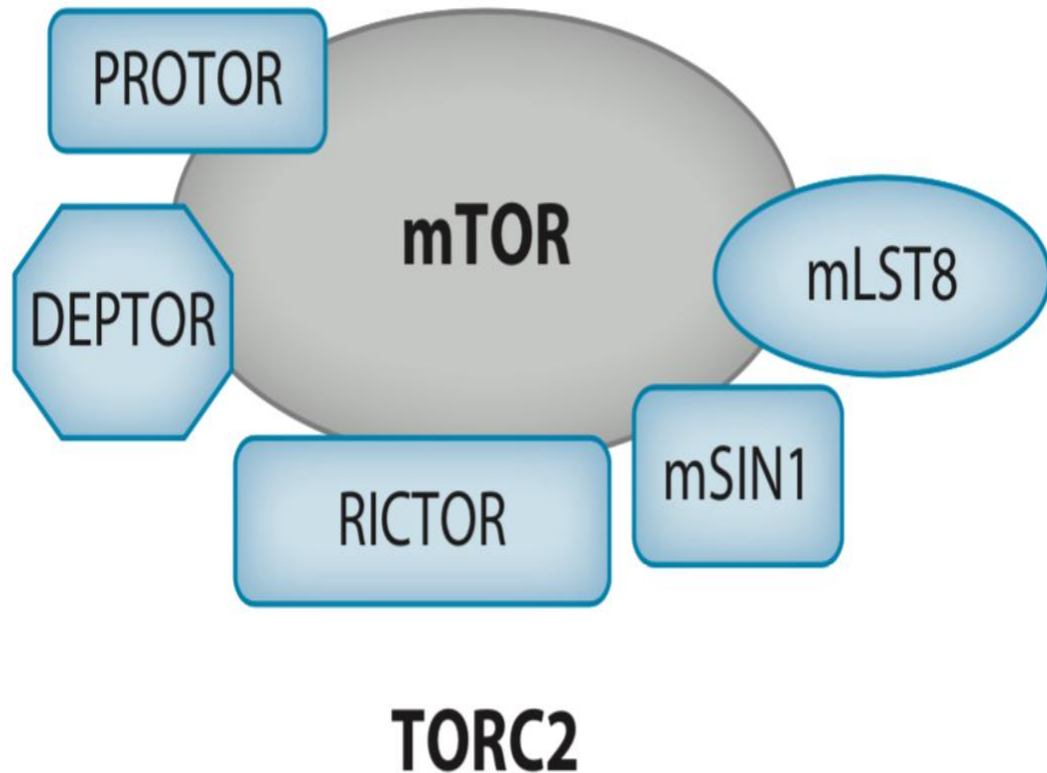
La proteína mTOR se puede encontrar formando parte de dos diferentes complejos, mTOR complejo 1 (mTORC1) (**Fig. 2**) y mTOR complejo 2 (mTORC2) (**Fig. 3**). Cada complejo está conformado por distintas proteínas y fosforila a diferentes substratos. mTORC1 fosforila a la proteína Raptor, así como al substrato de Akt, PRAS40; mientras que mTORC2 fosforila a Rictor, entre otras subunidades como mSin1 y Protor-1/2. Ambos, mTORC1 y mTORC2, comparten el complejo mLST8/GbL, necesario para el ensamblaje y la estabilidad del complejo regulador DEPTOR [37].

mTOR regula numerosos procesos necesarios para el crecimiento y el metabolismo celular, mediante la integración de señales de detección de nutrientes y de estrés celular como la biogénesis del ribosoma, la traducción de proteínas y la autofagia. A su vez, estos cambios los puede realizar mediante la activación o inactivación de S6K1, 4E-BP1, ULK1, entre otros [38].



**Fig. 2.** **mTORC1, es el gran regulador del metabolismo.** mTORC1 tiene la función principal de regular la activación del metabolismo. Este complejo está integrado por las proteínas DEPTOR, RAPTOR, PRAS40 y mLST8 las cuales activan diferentes vías de señalización “río abajo” como es la vía de 4E-BP1, p70 S6K, entre otras [37].





**Fig. 3. mTORC2 tiene una relación directa con la vía de la insulina.** La vía de mTORC2 se activa y ejerce la función de activación de las moléculas “río abajo” de los factores de activación de los receptores de insulina. Este complejo está integrado por las proteínas PROTOR, DEPTOR, RICTOR, mSIN1 y mLST8, las cuales activan diferentes vías de señalización “río abajo” como es la vía de AKT, PKC $\alpha$ , SGK1, entre otras [38].

En un modelo de *S. cerevisiae*, en donde Apg1 (Atg1 en mamíferos) se encontraba alterada, se demostró que se desencadenaban alteraciones en la autofagia aún en condiciones de escasez de nutrientes o de inhibición de TOR, sugiriendo que Apg1 tiene un efecto “río abajo” de TOR [39], [40]. De esta manera, se demostró que mTOR tiene una relación estrecha con la autofagia, ya que Atg1, tiene un papel fundamental en la etapa inicial de la autofagia en la nucleación y la formación de la estructura pre-autofagosoma (EPA) [39], [41], [42].

Durante más de una década, se ha generado evidencia de la relación de mTOR en la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas con fenotipos diferentes como la epilepsia, el autismo, el retraso mental, la demencia, entre otros [43], [44].

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas tienen en común la alteración de la señalización de mTOR, la cual se puede adjudicar a mutaciones directas de genes reguladores del mismo mTOR [45] o a genes externos relacionados a la vía de mTOR.

Con el constante incremento de la población adulto mayor, la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP, va en incremento. Por lo que la búsqueda de nuevas terapias experimentales resulta de gran interés para el ámbito científico. La alteración de la autofagia parece ser una de las posibles etiologías de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que experimentar con terapias que conduzcan a la inducción de la misma parece un camino prometedor.

La rapamicina, el agente farmacológico que permitió descubrir a TOR, es un fármaco con múltiples propiedades, por ejemplo, se ha demostrado que tiene la capacidad de extender la vida en varios organismos incluyendo el ratón. Por lo que esto nos abre el camino para el establecimiento de nuevas terapias contra enfermedades neurodegenerativas [46].

#### **1.1.4 La rapamicina como agente inmunosupresor**

La rapamicina es un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, la cual fue aislada por primera vez en una muestra recolectada de la Isla de Pascua [36].

En un principio a la rapamicina se le atribuyeron propiedades antifúngicas. Tiempo después se le adjudicaron propiedades como agente inmunosupresor, al ser capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T [28], [47], mediante el secuestro de aminoácidos necesarios para la traducción de proteínas esenciales para su proliferación celular [29]. Asimismo, la rapamicina tiene la capacidad de inhibir la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> a linfocitos T cooperadores y/o citotóxicos, de linfocitos B, y de células presentadoras de antígenos como los macrófagos [48].

La rapamicina tiene una estructura química similar al macrólido FK506, el cual es un inhibidor específico de la producción de IL-2 en los linfocitos T, a lo que puede deberse la similitud de esta propiedad inmunosupresora [30], [31], [32]. Estudios comparativos entre la rapamicina y el macrólido FK506 encontraron que ambas moléculas comparten un mismo sitio de unión al dominio FKBP12 de mTOR [49].

Tras el descubrimiento de la rapamicina diversos estudios identificaron su capacidad para inhibir la proliferación de células cancerígenas en modelos murinos. Simultáneamente, dadas las propiedades antes mencionadas, se llevó a cabo la experimentación de la rapamicina como agente inmunosupresor y coadyuvante terapéutico en los trasplantes de órganos [50], [51].

La rapamicina y los “rapalogos” están siendo utilizados como agentes terapéuticos en diversos tipos de cáncer en fase clínica [52], [53].

### **1.1.5 La función neuroprotectora de la rapamicina mediante la inducción de la autofagia y la inhibición de mTOR**

En el 2005, en un modelo de *Caenorhabditis elegans*, se demostró la capacidad de la rapamicina de contrarrestar los efectos del envejecimiento, y desde entonces se comenzó a estudiar su potencial terapéutico como agente anti-envejecimiento [54], [55].

En el 2009, estudios realizados por el “National Institute on Aging Interventions Testing Program”, replicaron el efecto anti-envejecimiento de la rapamicina en un modelo murino, por lo que los resultados alentaron al desarrollo de una nueva terapéutica encaminada a esa línea de investigación [56].

Un factor en común en las enfermedades neurodegenerativas es la alteración de la degradación de proteínas mal plegadas, lo que causa la formación de agregados proteicos que resultan tóxicos para las neuronas. Como se mencionó anteriormente, la autofagia es una de las vías de degradación de proteínas, y su deficiencia está relacionada con el proceso neurodegenerativo. Por lo que utilizar un agente que regule el funcionamiento de la autofagia representa una propuesta lógica y con potencial para prevenir el deterioro neuronal [53], [57].

Uno de los mejores inductores de autofagia es la rapamicina, la cual inhibe a mTOR, que de manera activa bloquea la autofagia [58].

En diferentes modelos experimentales de la EP inducidos genéticamente o mediante neurotoxinas, se ha demostrado que la rapamicina bloquea a mTORC1 y restaura el mecanismo de autofagia, lo que a su vez disminuye la acumulación de proteínas, las

alteraciones mitocondriales y la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra [53], [59] (**Tabla 1**).

Experimental model	Dosage of rapamycin	Phenotype or effect	Proposed mechanism	Refs
MPTP-treated mice	Pretreatment with rapamycin for 2 days (intraperitoneal injection, 10 mg per kg per day) followed by daily doses of rapamycin (intraperitoneal injection, 5 mg per kg per day) up to 4 days after the last MPTP injection	Attenuation of SNpc dopaminergic cell death and striatal dopaminergic terminal loss	Restored autophagic flux (enhanced lysosomal biogenesis, increased autophagosome-lysosome fusion and increased autophagosome clearance)	40
	Pretreatment with rapamycin for 2 days (intraperitoneal injection, 7.5 mg per kg per day) followed by daily doses of rapamycin up to 4 days after the last MPTP injection	In acute MPTP regimen: attenuation of SNpc dopaminergic cell death but not of striatal dopaminergic terminal loss In sub-acute MPTP regimen: decreased apoptotic cells (SNpc dopaminergic neurons not counted and striatal dopaminergic terminals not assessed)	Blockade of mTORC1-mediated translation of pro-cell death protein RTP801	39
Tg mice overexpressing WT $\alpha$ -synuclein under the regulatory control of a PDGF $\beta$ promoter	Intracerebral infusion of rapamycin into the lateral ventricle (20 mg per kg)	Attenuation of $\alpha$ -synuclein accumulation in neuronal cell bodies and synapses	Increased autophagy and enhanced lysosomal activation	54
Paraquat-treated <i>Drosophila melanogaster</i>	50, 200 and 400 $\mu$ M of rapamycin	Increased survival	Decreased translation and increased autophagy	73
	1 $\mu$ M of rapamycin in food	Increased survival	Increased mitophagy and decreased apoptosis	72
<i>D. melanogaster park</i> or <i>Pink1</i> mutants	Rapamycin added to standard fly food (0.5 mM for larval feeding and 200 mM for adult feeding)	Suppression of flight muscle degeneration, climbing deficits, mitochondrial alterations and dopaminergic neurodegeneration	Activation (hypo-phosphorylation) of 4E-BP	17
6-OHDA-treated mice	Levodopa (10 mg per kg) + benserazide (7.5 mg per kg) + rapamycin (2 and 5 mg per kg)	Attenuated levodopa-induced dyskinesias	Attenuation of mTORC1 hyperactivity in striatonigral GABAergic medium spiny neurons containing D1 receptors	74
Lactacystin-microinjected (substantia nigra) mice	One week after lactacystin microinjection, mice received rapamycin (intraperitoneal injection, 4 mg per kg per day) twice a week for 3 weeks	Attenuation of SNpc dopaminergic cell death and striatal dopamine depletion, and decreased accumulation of insoluble ubiquitinated proteins	Increased autophagy and increased levels of the anti-apoptotic protein BCL-2	53

4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; PDGF $\beta$ , platelet-derived growth factor- $\beta$ ; *Pink1*, PTEN-induced putative kinase 1; SNpc, substantia nigra pars compacta; Tg, transgenic; WT, wild type.

**Tabla 1. Efectos de la rapamicina en modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson.** Listado de los diferentes modelos *in vivo* con los que se ha probado el efecto neuroprotector de la rapamicina contra las alteraciones características de la EP [53].

Diversos estudios experimentales, *in vitro* e *in vivo*, han reportado que la rapamicina tiene propiedades terapéuticas contra otras enfermedades neurodegenerativas diferentes a la EP, y como terapia contra los efectos adversos del envejecimiento. En algunos modelos de la EH y de la EA se logró disminuir la presencia de agregados proteicos, mejorar la función cognitiva, e incluso incrementar la sobrevivencia. Es por ello que a la rapamicina se le puede considerar como un potencial agente neuroprotector [53] (**Tablas 2 y 3**).

Table 2 | **Effects of rapamycin or rapamycin analogues in experimental *in vivo* models of Huntington's and Alzheimer's diseases**

Experimental model	Dosage	Phenotype or effect	Proposed mechanism	Refs
<b>Huntington's disease</b>				
R6/2 mice (HDQ150)	Everolimus (10 or 20 $\mu$ mol per kg) from 4 weeks of age until sacrifice	Decreased soluble levels of mutant HTT in muscle but not in brain, improved motor performance and no effect on striatal atrophy	Induction of autophagy	82
<i>gmr-httQ120 Drosophila melanogaster</i>	2 mM rapamycin with 4.2 mM lithium	Attenuated rhabdomere degeneration	Additive induction of autophagy	77
	1 $\mu$ M rapamycin in food	Delayed rhabdomere degeneration	Induction of autophagy	27
Ross/Borchelt mice (N171-82Q)	Temsirolimus (intraperitoneal injection, 20 mg per kg); three injections per week from 4 to 16 weeks of age, followed by one injection every other week until 21 weeks of age	Decreased number and size of striatal aggregates and improved motor performance	Induction of autophagy	27
<b>Alzheimer's disease</b>				
3 $\times$ Tg-AD mice (Tg human APP <sub>Swe</sub> /Tg human tau <sub>P301L</sub> /PS1 knock-in)	10-week treatment of 6-month-old mice with food containing microencapsulated rapamycin (2.24 mg per kg)	Improved learning and memory deficits and reduced amyloid- $\beta$ and tau pathology	Restoration of mTOR hyperactivity to normal levels and increased autophagic degradation	85
PDAPP Tg mice (hAPP(J20))	Food containing microencapsulated rapamycin (2.24 mg per kg) for 13 weeks starting at 4 months of age	Improved cognitive deficits and decreased soluble levels of amyloid- $\beta$ 42	Induction of autophagy	88
Tg2576 mice	At 4 months of age, Tg2576 mice were injected with rapamycin (intraperitoneal injection, 3 mg per kg), 5 days per week for 2 weeks (10 days in total)	Increased amyloid- $\beta$ levels	Inhibition of ADAM10	103
Amyloid- $\beta$ 42-expressing <i>D. melanogaster</i>	Food containing 1 mM rapamycin	Decreased lifespan	Increased amyloid- $\beta$ 42 toxicity	104
<i>D. melanogaster</i> expressing WT and tau <sup>K180W</sup> in the eyes	Instant fly food containing 1 $\mu$ M rapamycin	Decreased toxicity of WT and R406W tau (reduced proportion of flies without eyes, increased proportion of flies with normal eyes) and increased survival	Induction of autophagy	95
	2.5 mM rapamycin in a yeast paste and fed to flies for 10 days after eclosion	Reduced number of TUNEL-positive neurons and neurodegenerative vacuoles	Inhibition of TOR-mediated activation of cell cycle and apoptosis by mutant tau	94

ADAM10, disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; APP, amyloid precursor protein; HTT, huntingtin; mTOR, mammalian target of rapamycin; PDAPP, platelet-derived growth factor promoter expressing amyloid precursor protein; PS1, presenilin 1; Tg, transgenic; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling; WT, wild type.

**Tabla 2. Efectos de la rapamicina y sus análogos en modelos *in vivo* de la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer.** La rapamicina en diferentes esquemas terapéuticos ha mostrado efectos benéficos en modelos experimentales de la EH y la EA [53].

Table 3 | Effects of rapamycin or a rapamycin analogue in other experimental *in vivo* models of neurodegeneration

Disease	Experimental model	Dosage	Phenotype or effect	Proposed mechanism	Refs
Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)	Transgenic mice expressing mutant full-length ataxin 3 with an expanded polyglutamine repeat region of 70 residues	Temsirolimus (intraperitoneal injection, 20 mg per kg) three times a week from 6 to 21 weeks of age	Improved motor performance, reduced number of ataxin-3-positive aggregates and decreased soluble mutant ataxin 3 levels	Induction of autophagy	106
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	SOD1 G93A transgenic mice	2 mg per kg per day (intraperitoneal injection) from 64 days of age until death	Accelerated motor neuron degeneration (earlier disease onset), shortened lifespan, unaffected SOD1 accumulations, enhanced mitochondrial impairment, higher BAX levels, greater caspase 3 activation and increased motor neuron cell death	Induction of autophagy	109
Retinal degeneration	RPEΔMT mutant mice*	3 mg per kg (intraperitoneal injection) from 4 weeks of age until sacrifice	Increased number and function of photoreceptors	Attenuation of mTOR-mediated stress-induced failure of RPE cell functions	124
Traumatic brain injury	Closed head injury in mice	One intraperitoneal injection (0.5–1 mg per kg) 4 hours after closed head injury	Improved functional recovery of injured mice and attenuated neuron cell loss in cortex	Decreased microglial activation	121
Cerebral ischaemia	Neonatal cerebral hypoxia-ischaemia in rat pups (postnatal day 7) by ligation of the right common carotid artery followed by 2.5 h hypoxia (92% nitrogen and 8% oxygen)	Intracerebroventricular injection (0.1 ng per μL) 20 min before hypoxia-ischaemia	Decreased caspase 3 activation, decreased propidium iodide-labelled cells, decreased cell loss in cerebral cortex and hippocampus and decreased infarct volume	Induced autophagy and reduced apoptosis	123

mTOR, mammalian target of rapamycin; RPE, retinal pigment epithelium; SOD1, superoxide dismutase 1. \*Mice with RPE-selective postnatal loss of oxidative phosphorylation.

**Tabla 3. Efectos de la rapamicina y sus análogos en modelos *in vivo* de diversas enfermedades neurodegenerativas.** La rapamicina se ha usado como agente neuroprotector en diversos modelos experimentales de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Machado-Joseph, la ELA, la degeneration retinal, los traumatismos craneoencefálicos y la isquemia cerebral [53].

Por lo tanto, el enfoque terapéutico de mTOR podría enfocarse a inhibir específicamente a mTORC1, por lo que se requiere realizar diversos estudios que permitan establecer la dosis adecuada sin afectar al sistema inmunitario [53].

La inducción de la autofagia con el fármaco rapamicina tiene efectos neuroprotectores. Sin embargo, es importante tener algunas consideraciones especiales: primero, el estado fisiopatológico del sujeto a tratar; segundo, el nivel en el que la autofagia está siendo afectada; y tercero, el posible efecto adverso que puede causar el uso crónico de la rapamicina [60].

A pacientes que se les realizó un trasplante renal, se les administró rapamicina como agente terapéutico coadyuvante al trasplante, estos han presentado efectos adversos como neumonía intersticial, niveles elevados de triglicéridos, anemia y reducción de los

niveles de cicatrización, sin presentar ningún tipo de efecto adverso a nivel neurológico [61].

Actualmente, la rapamicina es ampliamente utilizada ante diversas patologías. Sin embargo, no existen estudios histopatológicos que demuestren la seguridad de su uso crónico como agente neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas.

Diversos estudios han revelado los efectos adversos de la rapamicina, lo cual tiene una relación directa con la dosis y el esquema terapéutico empleado. Por lo que evaluar el posible efecto de una dosis neuroprotectora, que es 50 veces menor a la dosis que se utiliza como agente inmunosupresor, en un esquema intermitente de 7 semanas, resulta algo innovador, con grandes posibilidades de optimizar la terapia neuroprotectora.

Un mayor entendimiento de la vía de mTOR y su relación con la autofagia nos podría dar un mejor panorama de la actividad de la rapamicina, por lo que el estudio del efecto del uso crónico de la rapamicina como agente neuroprotector resulta de gran interés [62-63].

## 1.2 Justificación

Debido al potencial terapéutico de la inducción de la autofagia con rapamicina para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y puesto que se ha observado que no ejerce un efecto adverso sobre las funciones motoras y cognitivas, es de gran relevancia realizar un análisis histológico del efecto de la inhibición de mTOR mediada por rapamicina, para determinar la seguridad del uso terapéutico de la dosis que ejerce un efecto neuroprotector contra estas enfermedades.



### **1.3 Hipótesis**

La administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina no induce alteraciones morfológicas asociadas a la inactivación de mTOR *in vivo*.

## **1.4    Objetivo General**

Determinar si la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina induce alteraciones morfológicas asociadas a la inactivación de mTOR *in vivo*.

## **1.5           Objetivos Específicos**

- 1.5.1**           Analizar la morfología de órganos en respuesta al tratamiento con rapamicina *in vivo*.
- 1.5.2**           Determinar el efecto inmunosupresor de la rapamicina *in vivo*.
- 1.5.3**           Determinar el efecto de la dosis neuroprotectora de rapamicina sobre la vía de la autofagia *in vivo*.

## Capítulo 2

### 2.1 Materiales y Métodos

#### 2.1.1 Modelo animal

Se utilizaron 12 ratones de la cepa C57BL6/J, obtenidos de Círculo ADN S.A de C.V. de 8 semanas de nacidos, con un peso inicial promedio de 25 mg. Los ratones se mantuvieron en un ambiente en donde se regulaba la temperatura de manera constante, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h. Los ratones tuvieron libre acceso al agua y al alimento, y se les cambiaba el aserrín, el alimento y el agua cada tercer día. El modelo experimental de la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* se estableció de la siguiente manera:

Se inició con dos grupos, el primer grupo, “control”, estuvo conformado por 6 ratones a los cuales se les administraron 100 µl de PBS 1X por vía intraperitoneal (IP), durante 7 semanas, 3 veces por semana; el segundo grupo, “rapamicina”, estuvo conformado por 6 ratones a los cuales se les administraron 100 µl de rapamicina a una concentración de 1 mg/kg, con la misma posología que el grupo “control”. El modelo se realizó por triplicado.

### **2.1.2 Evaluación del peso corporal**

A cada ratón se le estuvo monitoreando el peso a lo largo de las 7 semanas de tratamiento. Al inicio de cada semana se registró el peso de cada sujeto. Al finalizar las 7 semanas de monitoreo se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante una ANOVA de dos colas.

### **2.1.3 Técnica histológica, tinción con Hematoxilina y Eosina (HyE)**

Al finalizar las 7 semanas de tratamiento, 3 ratones de cada grupo fueron sacrificados con el siguiente protocolo:

A cada ratón se le administraron 500  $\mu$ l del anticoagulante heparina (5000 UI), con aguja de insulina por vía IP, 10 min previos al sacrificio. Posteriormente, los ratones fueron anestesiados con Avertin® mezclado con el analgésico xilacina (presentación 20 mg/ml) en un volumen de 750  $\mu$ l (500 mg/kg de Avertin® con 150 mg/kg de xilacina) por vía IP, con aguja de insulina. Después de comprobar el plano quirúrgico mediante la evaluación de 3 punto reflejos: patas, cola y reflejo corneal, se procedió a iniciar la técnica de perfusión cardíaca mediante la inmovilización del animal, fijándolo a una placa de poliestireno con sujetadores. Luego, se realizó una incisión con el bisturí a la altura del apéndice xifoides, y con ayuda de unas tijeras se realizó un corte longitudinal por la línea media ventral, cortando en toda su extensión el esternón hasta el mango de este. Posteriormente, se separó y exhibió la cavidad torácica. Una vez realizado lo anterior, se procedió a fijar los órganos mediante perfusión cardíaca. Para esto, se colocó un catéter de 21 G x 32 mm de diámetro dispuesto en una bomba peristáltica, en el ventrículo izquierdo. Con ayuda de unas tijeras se realizó una pequeña incisión en la aurícula izquierda, tras finalizar el orificio de entrada y la apertura del agujero de salida, y se bombeó (a una presión de 80-100 mm Hg) un volumen de 50 ml de una solución de buffer de fosfatos (PBS 1X, PH 7.4 a temperatura ambiente) con la finalidad de eliminar el contenido hemático. A continuación, se bombeó un volumen de 50 ml del fijador paraformaldehído

(PFA) 4% o fijador de Carnoy, con el fin de preservar el contenido celular lo más parecido al estado vivo. Después, se extrajeron los órganos de interés: el hígado, los riñones, el páncreas y el bazo, los cuales se dejaron fijando por 24 h. En seguida, se llevó a cabo el procesamiento, inclusión en bloques de parafina y microtomía de los órganos de interés con la técnica histológica convencional. Se llevó a cabo la evaluación histológica en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. A las muestras se les realizó la tinción de HyE con el fin de observar la histología general de los órganos e identificar posibles alteraciones.

#### **2.1.4 Tinción Tricrómico Mallory-Azán**

Se siguió el protocolo antes descrito para la obtención de cortes de 5  $\mu\text{m}$ , a los cuales se les realizó la tinción tricrómico de Malloy-Azán para diferenciar las fibras de colágeno. La tinción Mallory-Azán es utilizada para detectar las fibras de colágeno propias del tejido conectivo utilizando azul anilina, ácido Fuchsia, y naranja G. Como resultado, esta técnica de tinción permite identificar colágeno, citoplasma y glóbulos rojos [65].

#### **2.1.5 Inmunohistoquímica**

A partir de cortes de bazo de 5  $\mu\text{m}$  montados en laminillas silanizadas se realizaron inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos. Las laminillas obtenidas de bazo fueron utilizadas para detectar la expresión de: linfocitos T CD3<sup>+</sup> con el anticuerpo primario anti-CD3 (Dako® A0452) a una dilución 1:1500; linfocitos T CD4<sup>+</sup> con el anticuerpo primario anti-CD4 (Santa Cruz® SC-1140) a una dilución 1:100; linfocitos T CD8<sup>+</sup> con el anticuerpo primario anti-CD8 (Santa Cruz® SC-7188) a una dilución 1:200; linfocitos B CD20<sup>+</sup> con el anticuerpo primario anti-CD20 (Santa Cruz® SC-7735) a una dilución 1:100; y macrófagos CD68<sup>+</sup> con el anticuerpo primario anti-CD68 (Abcam® ab22506) a una dilución 1:1000. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo o anti-ratón) a una dilución de 1:1000, por 1 h a temperatura ambiente. Después, se adicionó el cromógeno

diaminobencidina (DAB), como sustrato para la enzima conjugada a los anticuerpos secundarios (peroxidasa de rábano). Los resultados fueron analizados en campo claro a un aumento de 10 y 40X, en un microscopio Nikon Eclipse 50i®, y se obtuvieron microfotografías mediante el software Q-capture 7 pro®.

#### **2.1.5.1 Morfometría de los resultados obtenidos por técnica de inmunohistoquímica**

A partir de las detecciones por inmunohistoquímica se realizó la cuantificación del área positiva ( $\mu\text{m}^2$ ) para el marcador correspondiente. Para llevar esto a cabo, se delimitó el área de interés. La morfometría se llevó a cabo en el programa Image J® en donde se utilizó la herramienta de “polígono” para delimitar el área de interés para la inmunodetección específica para los linfocitos T CD3+, linfocitos citotóxicos CD8+, linfocitos cooperadores CD4+, linfocitos B CD20+, así como macrófagos CD68+, esto en 10 campos, a un aumento de 10X con un microscopio Nikon Eclipse 50i®, por sujeto, en un total de 3 sujetos por grupo.

#### **2.1.6 Inmunofluorescencia**

A partir de cortes de páncreas de 5  $\mu\text{m}$  montados en laminillas silanizadas se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos específicos para detectar las células alfa secretoras de glucagón con el anticuerpo primario anti-glucagón (Abcam® ab92517) a una dilución 1:1000, así como las células beta secretoras de insulina con el anticuerpo primario anti-insulina (Abcam® ab181547) a una dilución 1:1000. Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (Abcam® ab150080) a una dilución de 1:1000, por 1 h a 4°C. Para observar el núcleo se utilizó el fluorocromo azul DAPI incluido en el medio de montar VectaShield®. Los resultados fueron analizados mediante microscopia de fluorescencia a un aumento de 10 y 40X, en un microscopio Nikon Eclipse 50i® adaptado a una fuente de poder para fluorescencia, y las imágenes fueron obtenidas mediante el software Q-capture 7 pro®.

### **2.1.6.1 Morfometría de los resultados obtenidos por técnica de inmunofluorescencia**

Se realizó la cuantificación de las unidades relativas de fluorescencia (URF) para la señal positiva correspondiente. Para llevar esto a cabo, se utilizó el programa Image J®. La morfometría se llevó a cabo tomando la señal positiva para la inmunodetección específica para los linfocitos T CD3+, linfocitos citotóxicos CD8+, linfocitos cooperadores CD4+, linfocitos B CD20+, así como macrófagos CD68+, esto en 3 campos, a un aumento de 40X con un microscopio de fluorescencia, por sujeto, en un total de 4 sujetos por grupo.

### **2.1.7 Extracción de proteínas**

Al finalizar las 7 semanas de tratamiento, 3 ratones de cada grupo fueron sacrificados mediante dislocación cervical, previamente anestesiados y se colectaron el hígado y el páncreas. Una porción de 2 mm de tejido fue triturada con una navaja y se colocó en un tubo eppendorf de 1.75 ml con 150 µl de buffer RIPA y 1.5 µl de inhibidor de proteasas y fosfatasa (100X). Después, las muestras se sonicaron (Ultrasonic Processor®) por 5 segundos (un pulso) y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4°C. Al finalizar esto, se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. Para determinar la concentración de proteínas obtenida, se llevó a cabo su cuantificación mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento.



### **2.1.8 Electroforesis**

Del extracto proteínico obtenido, se tomaron 50-100 µg por muestra y se mezclaron con el buffer de carga 6X. Se procedió a desnaturalizar las muestras a 95°C por 5 min, y se analizaron por triplicado mediante geles discontinuos de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en una cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad®) con buffer Tris-Glicina 1x. Se evaluó el marcador de autofagia LC3-II, el cual nos indica la presencia de la doble membrana del autofagosoma, en geles de poliacrilamida al 15%. La presencia de mTOR fosforilado y mTOR total se evaluó en geles de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se realizó a 80 Volts y 500 mA, por 3 h.

### **2.1.9 Transferencia en cámara semi-húmeda**

Después de la electroforesis se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa previamente activadas con dH<sub>2</sub>O. Tanto el gel, como la membrana y el papel filtro fueron impregnados con el buffer de transferencia 1X para elaborar el “sandwich”. Los geles se colocaron en contacto con la membrana de nitrocelulosa entre los papeles filtro dentro una cámara de transferencia semi-húmeda (Enduro semi-dry 20, E2020-SDB, Labnet®) bajo las siguientes condiciones: 25 Volts y 500 mA, por 1 h 30 min, con una fuente de poder (Enduro power supplies 300V, E0303, Labnet®).

### **2.1.10 Western Blot**

Terminada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecífica en las membranas con una solución bloqueadora de leche semi-descremada al 10% por 2 h. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 10 min cada uno. Después se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes. Para identificar la fosforilación de mTOR se utilizó un anticuerpo primario anti-pmTOR (phospho S2448) (Abcam® ab109268) a una dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C en constante agitación. Para el análisis de la expresión de mTOR total se utilizó el anticuerpo primario anti-mTOR (Abcam® ab2732) a una dilución de 1:1000, el cual fue incubado toda la noche a 4°C. Luego, se evaluó el marcador de autofagia LC3-II utilizando el anticuerpo primario anti-LC3-II (Sigma® L7543) a una dilución de 1:1000, durante toda la noche a 4°C. Como control de carga se utilizó el anticuerpo primario anti-B-actina (R&D Systems® MAB8929) a una dilución 1:5000. Tras incubar con el anticuerpo primario, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo o anti-ratón) a una dilución de 1:1000, por 1 h a temperatura ambiente. La membrana fue revelada con el kit SuperSignal<sup>TH</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher®), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los resultados obtenidos fueron documentados en un escáner C-DiGit Blot de la marca LI-COR®.

### **2.1.11 Análisis estadístico**

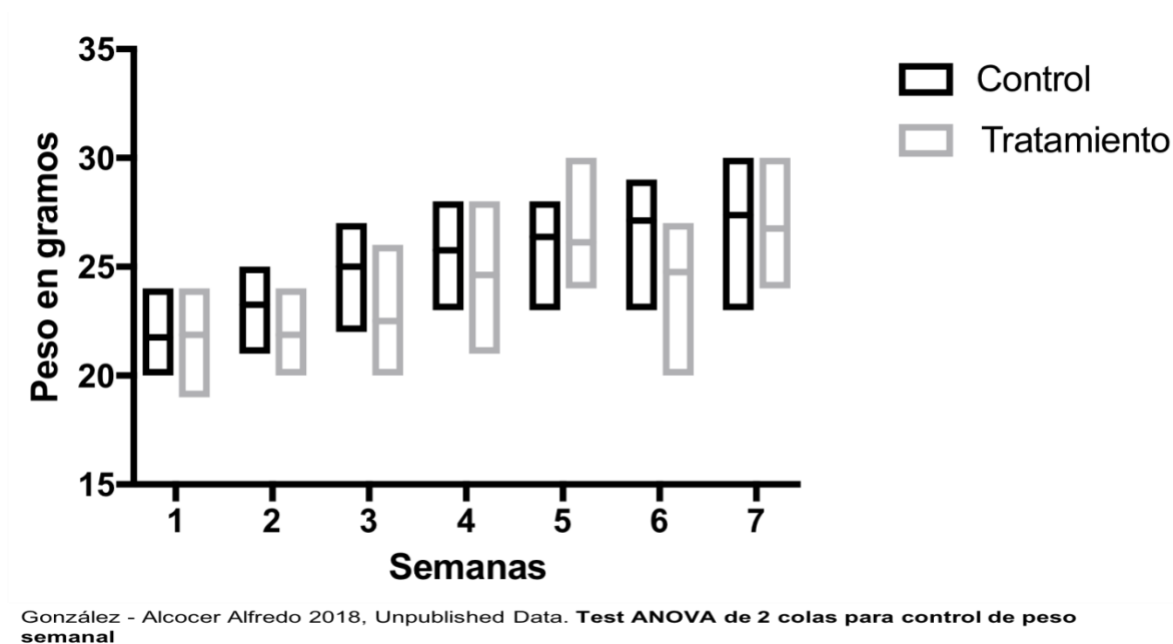
El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa GraphPad Prism 7 pro®, utilizando pruebas paramétricas y no paramétricas. Los resultados se contrastaron por medio de la prueba t de Student para identificar diferencias significativas en relación a su grupo control, análisis de varianza (ANOVA) para la identificación de diferencias de las varianzas inter-grupos, y la prueba de Tukey para identificar de cual(es) grupo(s) dependían las diferencias de las varianzas inter-grupo en caso de presentarse. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## Capítulo 3

### 3.1 Resultados

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la rapamicina tiene efectos neuroprotectores en diversos modelos de neurodegeneración. Sin embargo, también tiene propiedades inmunosupresoras. Aunque las dosis de rapamicina que ejercen un efecto neuroprotector son aproximadamente 50 veces menores a las empleadas para suprimir al sistema inmunitario en individuos sometidos a trasplantes. Por lo tanto, es de gran relevancia determinar si inducen algún efecto adverso a nivel sistémico a esta dosis. Por lo que evaluamos el efecto de una dosis neuroprotectora de la rapamicina en un modelo *in vivo*.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL6/J de 8 semanas de nacidos, con un peso inicial promedio de 25 g. Se realizó la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina (1 mg/kg) por vía I.P. 3 veces por semana durante 7 semanas. Al grupo control se le administró una solución vehículo de PBS 1X. A lo largo del modelo experimental se monitoreó el peso corporal semanalmente, en donde no se observó una diferencia significativa entre los grupos control y tratado con rapamicina (**Fig. 4**).



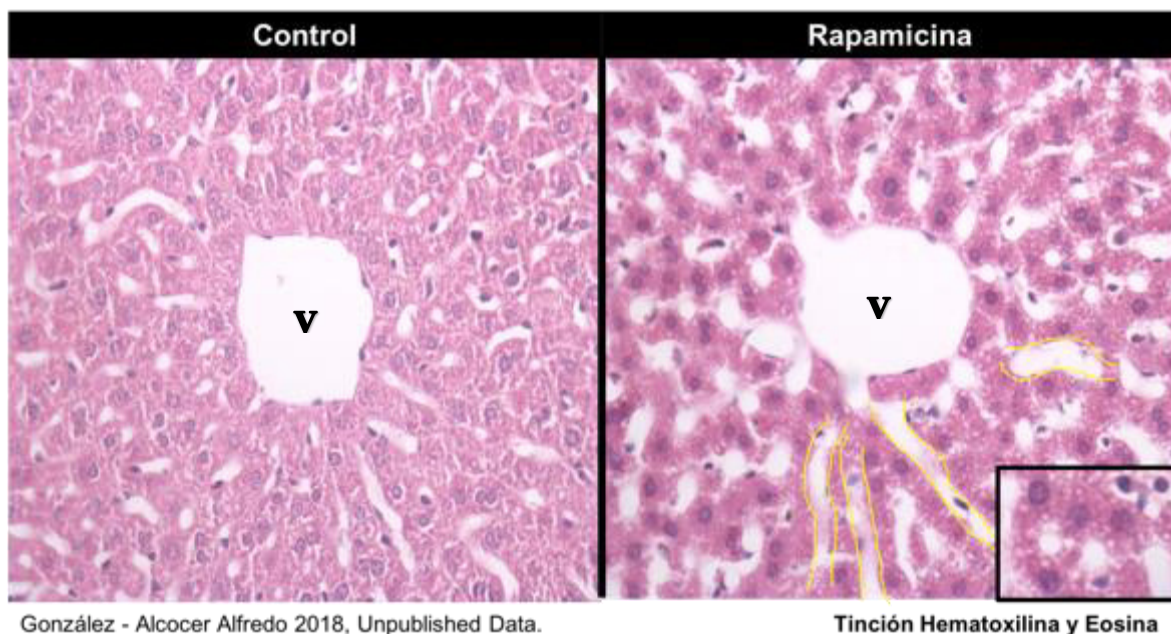
**Fig 4.** La rapamicina no afecta el peso corporal. Evaluación semanal del peso corporal del modelo *in vivo*, comparando al grupo control (PBS 1X) contra el grupo tratado con rapamicina (1 mg/kg), en donde no se observa una diferencia estadísticamente significativa, se empleó la prueba de de ANOVA de 2 colas.

### **3.1.1 Análisis morfológico de órganos blanco en respuesta a la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo***

Posteriormente, se extrajeron órganos que pudieran ser afectados por el fármaco, donde se incluyeron el hígado, el riñón, el páncreas y el bazo. A partir de los órganos seleccionados, se realizaron análisis mediante técnicas de histoquímica e inmunodetección.

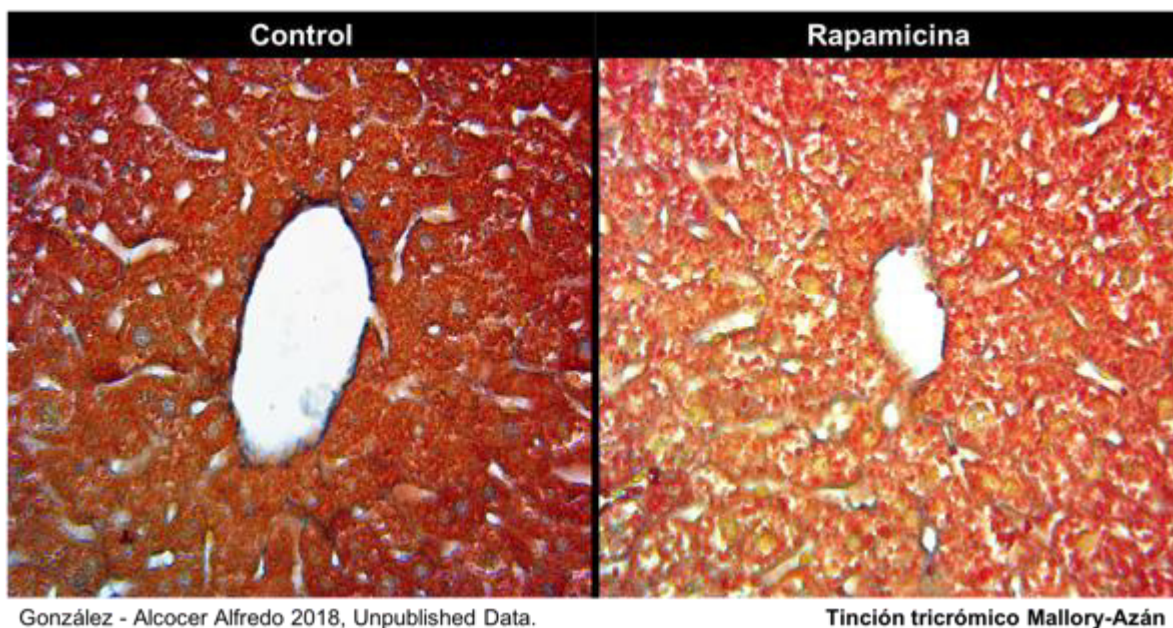
#### **3.1.1.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* causa cambios morfológicos en hígado**

El hígado es el órgano encargado de degradar y conjugar fármacos y toxinas que ingresan al organismo para que se puedan eliminar con facilidad. Por lo tanto, fue de gran importancia evaluar el efecto de la rapamicina en este órgano a nivel histológico. Con la finalidad de observar la histología general del hígado, se realizó una tinción con HyE. El hígado del grupo control mostró una organización normal del parénquima, que consiste en cordones de hepatocitos de una célula de espesor separados por capilares sinusoidales. Sin embargo, al evaluar al grupo tratado con rapamicina se observó una histología anormal, caracterizada por una dilatación de los sinusoides hepáticos, así como la presencia de hepatocitos con citoplasma de aspecto vesiculado (**Fig. 5**).



**Fig. 5. Alteraciones histológicas inducidas por la rapamicina en hígado.** La imagen del lado izquierdo corresponde al grupo control, en donde se observa una vena central (V), rodeada por hepatocitos, entre ellos se observan los sinusoides hepáticos. La imagen del lado derecho corresponde al grupo tratado con rapamicina (1mg/kg), donde se observa una vena central normal (V), más sin embargo hay una dilatación de los sinusoides hepáticos (**líneas amarillas**). En el recuadro de la esquina inferior derecha, se observa una ampliación que muestra el aspecto vesiculado de los hepatocitos. Microfotografías de hígado 400X, tinción con HyE.

Usualmente, cuando hay una alteración a nivel celular, como la disminución o reorganización de las células, ésta se ve acompañada del desarrollo de una fibrosis, es decir, de una mayor producción de fibras de colágeno. Por lo que evaluamos la presencia de algún tipo de alteración a nivel de las fibras de colágeno mediante la tinción de tricrómico Mallory-Azán, la cual nos permite visualizarlas de una coloración azul. Como resultado se observó que no hubo alteración alguna en la distribución y cantidad de fibras de colágeno de los grupos control y tratado con rapamicina (**Fig. 6**).



**Fig. 6. La rapamicina no induce incremento de fibras de colágena en hígado.**

Las fibras de colágeno se observan de una coloración azul. Se observa la escasa presencia de fibras de colágeno en los grupos control y tratado con rapamicina, Microfotografías de hígado 400X, tinción con tricrómico Mallory-Azán.

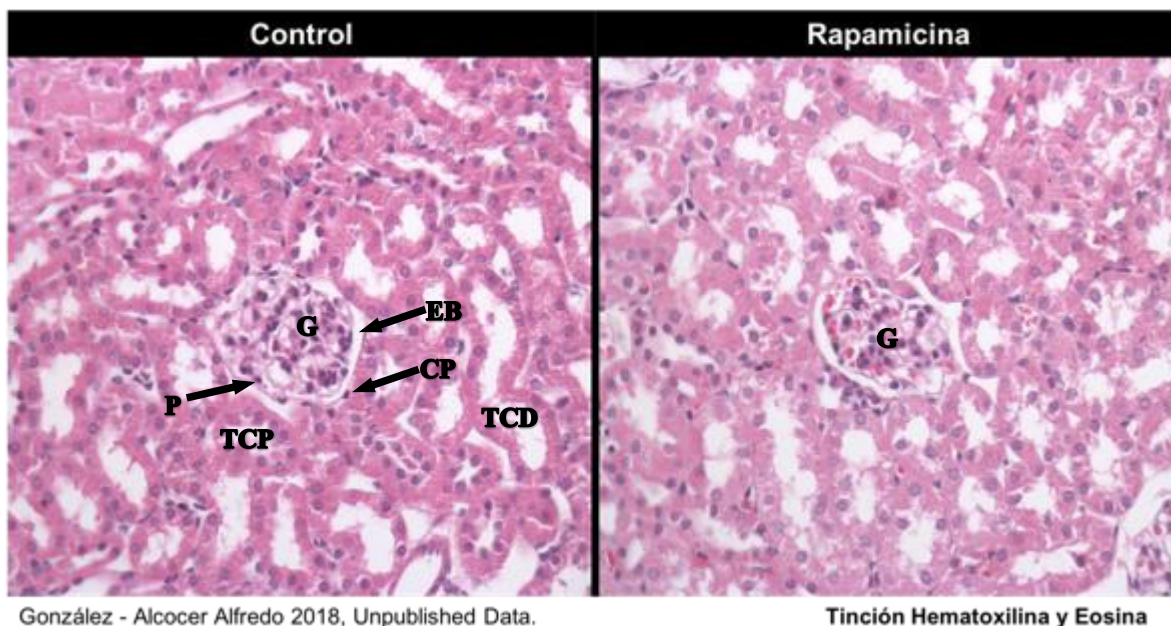
Con ello se pudo concluir que, a nivel hepático, la rapamicina causa una dilatación de los sinusoides hepáticos, así como la acumulación de cuerpos de aspecto vesiculado en el citoplasma de los hepatocitos.

### **3.1.1.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no afecta la morfología del riñón**

El riñón es el órgano encargado de filtrar, recuperar macromoléculas esenciales, y excretar los metabolitos que no fueron utilizados en el organismo, por lo que fue de gran importancia evaluar el efecto de la rapamicina a nivel histológico.

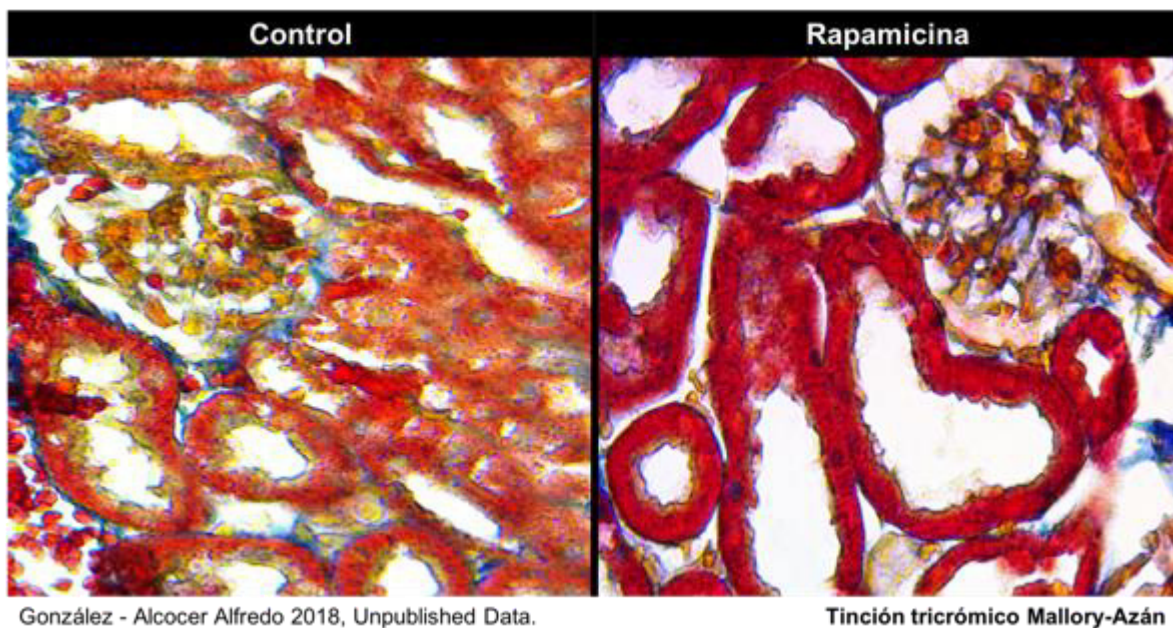
Mediante la tinción con HyE, se pudo apreciar la preservación de la arquitectura normal de riñón en el grupo tratado con rapamicina comparado con el grupo control. En la **figura 7** se aprecia micrografías de la región del laberinto cortical, en donde se observa también la presencia de un corpúsculo renal en el centro, el cual está compuesto por un capilar glomerular en forma de ovillo y el epitelio de las capas visceral y parietal de la cápsula de Bowman, compuestas por podocitos y epitelio plano simple, respectivamente. Asimismo, se observan secciones transversales de túbulo contorneado proximal, que están compuestos por un epitelio cúbico simple que se caracteriza por la presencia de un ribete en cepillo (microvellosidades) en la región apical y una luz con forma estrellada, así como algunos túbulo contorneado distal, que están formados por células epiteliales cúbicas con microvellosidades poco desarrolladas y luz redondeada.





**Fig. 7.** La rapamicina no altera la histología del riñón. La imagen del lado izquierdo corresponde al grupo control, en donde se observa un glomérulo central (**G**), con su capa parietal (**CP**) y visceral, esta última formada por los podocitos (**P**), entre ellos el espacio de Bowman (**EB**), así como segmentos transversales de túbulos contorneados proximales (**TCP**) y túbulos contorneados distales (**TCD**) contiguos al glomérulo. La imagen del lado derecho, corresponde al grupo tratado con rapamicina (1 mg/kg) en donde se observa un glomérulo central (**G**), así como las estructuras señaladas en el grupo control, ambos grupos con una histología normal, sin cambios. Microfotografías de riñón 400X, tinción con HyE.

Se evaluó la presencia de algún tipo de alteración a nivel de las fibras de colágeno, mediante la tinción de tricrómico Mallory-Azán, en donde no se observó alteración alguna en la distribución y cantidad de fibras de colágeno en los grupos control y rapamicina (**Fig. 8**).



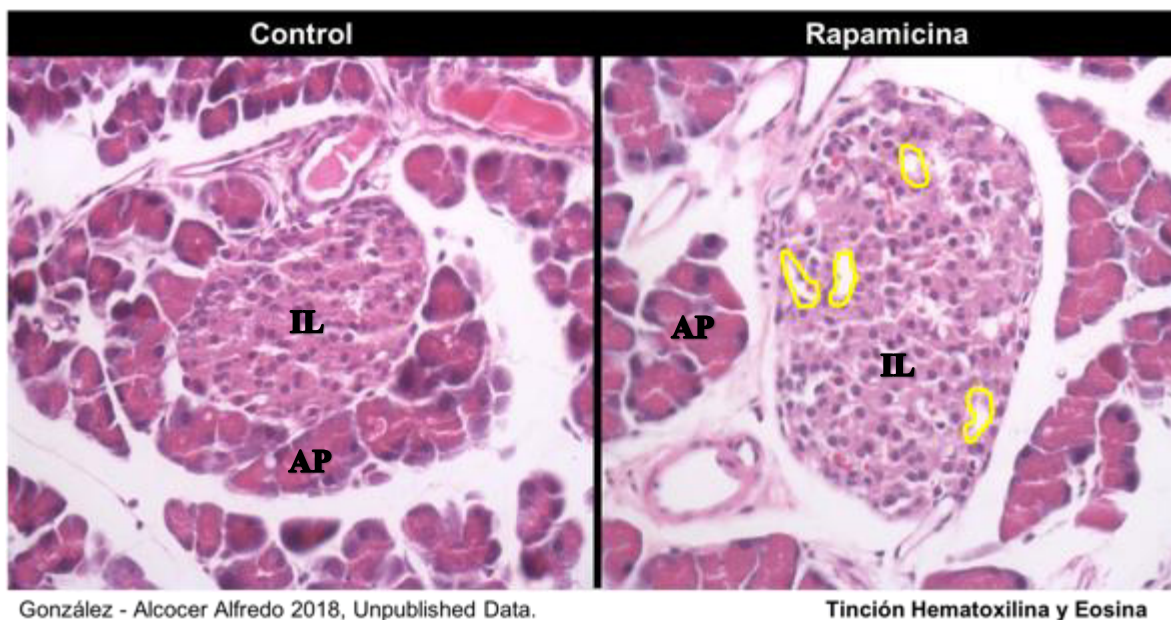
**Fig. 8.**        **La rapamicina no induce fibrosis renal.** Las fibras de colágeno se observan de una coloración azul. Se observa la escasa presencia de fibras de colágeno en los grupos control y tratado con rapamicina. Microfotografías de riñón 400X, tinción con tricrómico Mallory-Azán.

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que la rapamicina no genera alteraciones histológicas a nivel del riñón.

### **3.1.1.3 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* causa cambios morfológicos en páncreas**

Existe evidencia que relaciona el uso de la rapamicina en esquemas de tratamiento como inmunosupresor, esta puede resultar ser tóxico para las células beta [66], por lo que nos interesó evaluar qué efecto pudiera presentarse al utilizar el mismo fármaco como dosis neuroprotectora que es 50 veces menor a la dosis utilizada como inmunosupresor. Por lo que se llevó a cabo un análisis morfológico con la finalidad de esclarecer el efecto de la rapamicina sobre el páncreas a nivel histológico.

Se realizó la tinción de HyE para analizar la histología del páncreas del grupo control, y se comparó con la del grupo del tratamiento con rapamicina. El páncreas es una glándula exocrina y endocrina, y posee una cápsula de tejido conjuntivo que forma tabiques que dividen el parénquima en lobulillos. El páncreas exocrino está compuesto por acinos de tipo seroso formados por células piramidales. El páncreas endocrino está conformado por cúmulos de células organizadas en estructuras esféricas, que se encuentran dispersas por toda la porción exocrina, y se les conoce como islotes de Langerhans. El páncreas del grupo control presentó una organización histológica normal, mientras que en el grupo rapamicina se pudo apreciar una dilatación de la red de capilares fenestrados del islote de Langerhans (**Fig. 9**).

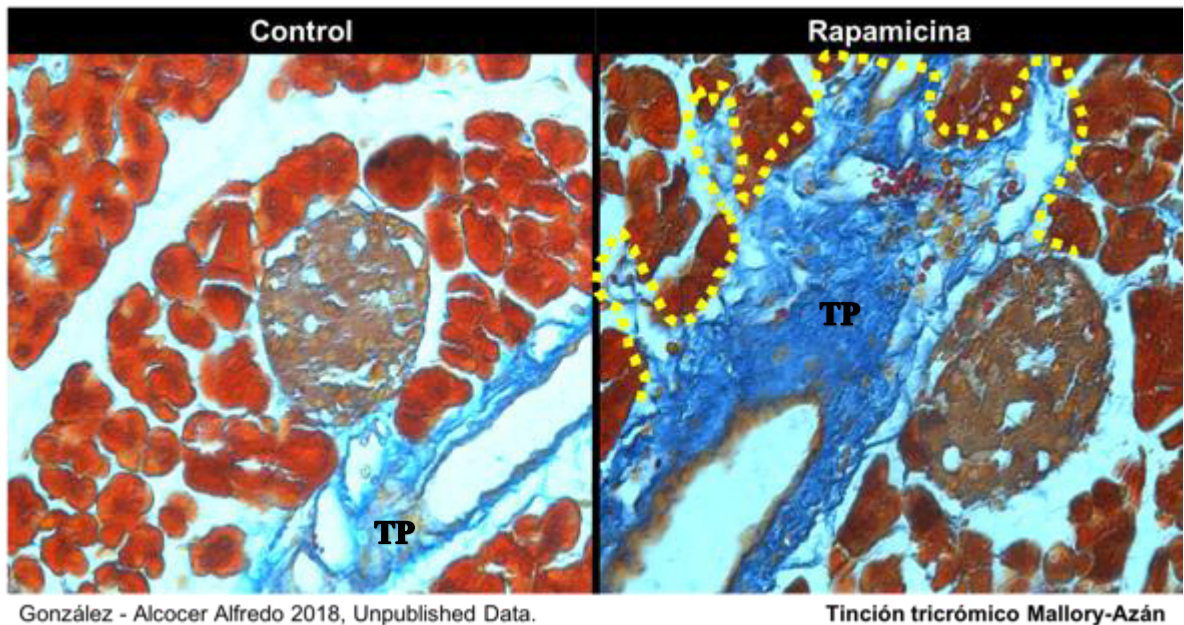


**Fig. 9.** La rapamicina causa dilatación de los capilares que se encuentran en el islote de Langerhans. Se muestra la organización histológica normal de los acinos pancreáticos (AP) de la porción exocrina, y un islote de Langerhans (IL) de la porción endocrina, en el grupo control. En el grupo tratado con rapamicina el páncreas exocrino (AP) no presenta ningún cambio histológico, mientras que hay una dilatación de los capilares (círculos amarillos) ubicados en el islote de Langerhans (IL). Microfotografías de páncreas 400X, tinción con HyE.

Al ver estos cambios, se evaluó la organización de las fibras de colágeno mediante la tinción de tricrómico Mallory-Azán. Como se mencionó, el páncreas está formado por lobulillos delimitados por tabiques de fibras de colágeno. En el grupo control, se pudo apreciar la organización histológica normal de las fibras de colágeno, mientras que en el grupo tratado con rapamicina, se observó una alteración en la distribución de las fibras



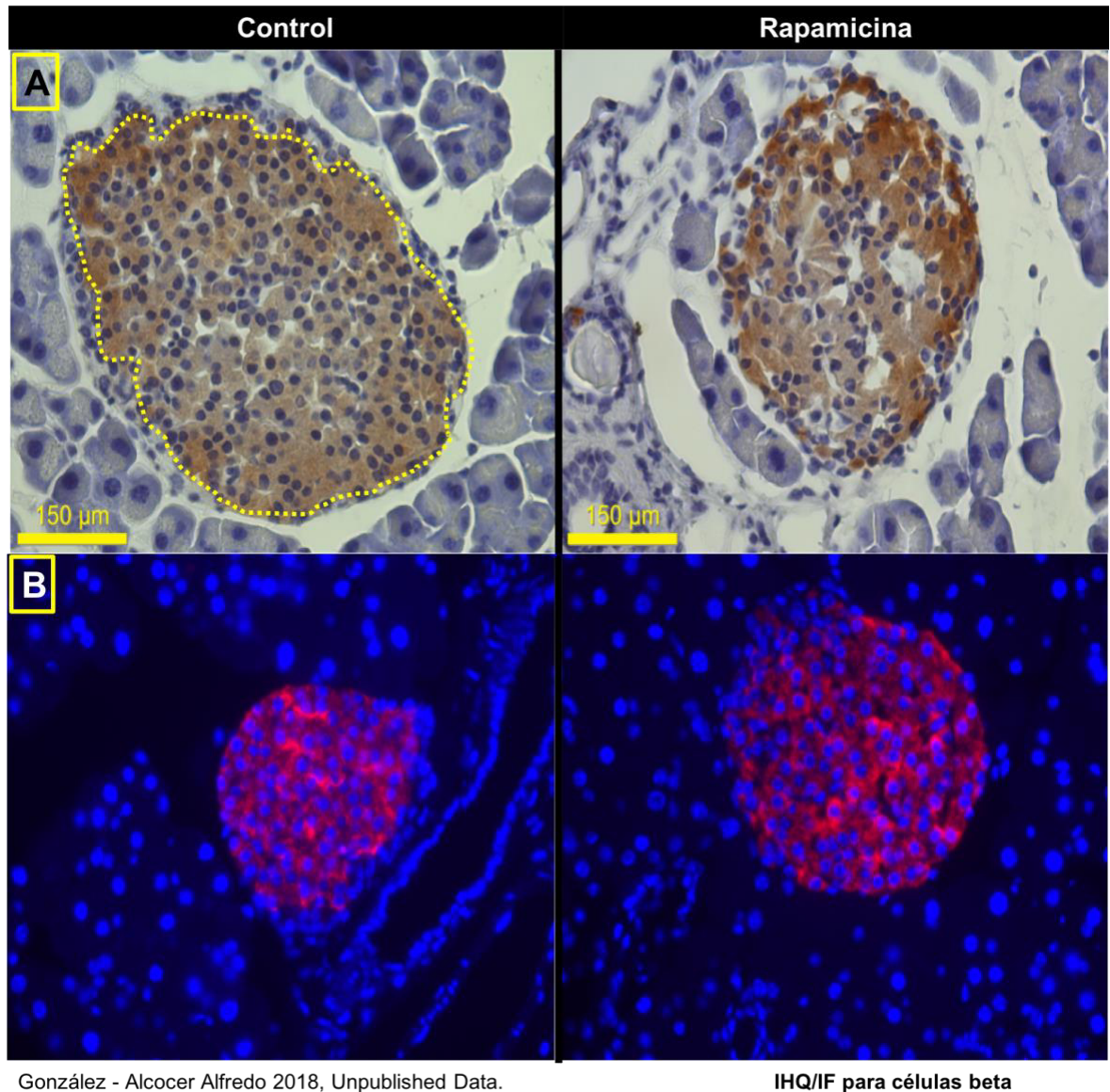
de colágeno que forman los tabiques, ya que se distribuyeron hacia el interior del páncreas exocrino, y rodeando la periferia de islotes de Langerhans. (**Fig. 10**).



**Fig. 10.** La rapamicina causa alteraciones en la distribución de las fibras de colágeno que conforman los tabiques pancreáticos. En el grupo control se observa la presencia de fibras de colágeno de color azul dispuestas longitudinalmente formando el tabique pancreático (TP). En el grupo tratado con rapamicina se observa una histología anormal, ya que las fibras del tabique pancreático (TP) se distribuyen hacia el interior del páncreas exocrino y endocrino (**línea punteada amarilla**). Microfotografía de páncreas 400X, tinción con tricrómico Mallory-Azán.

Posteriormente, evaluamos si la rapamicina ejercía algún efecto sobre las células de los islotes pancreáticos, de manera específica sobre las células-beta productoras de insulina y las células-alfa productoras de glucagón. Una de las características del páncreas

murino, que lo distingue del páncreas humano, es la distribución de las células-alfa y -beta. Normalmente, las células-alfa del islote pancreático murino se localizan exclusivamente en la periferia del islote de Langerhans, mientras que las células-beta se localizan en el interior de este. Mediante la técnica de inmunohistoquímica para la detección de células-beta, en el control se pudo observar la distribución normal de dicha población celular ubicada exclusivamente en el interior del islote de Langerhans, mientras que en el grupo tratado con rapamicina se distribuyeron tanto en el interior como en la periferia del islote (**Fig. 11A**). Posteriormente, confirmamos este resultado mediante inmunofluorescencia, en donde se repitió el resultado previamente descrito (**Fig. 11B**).



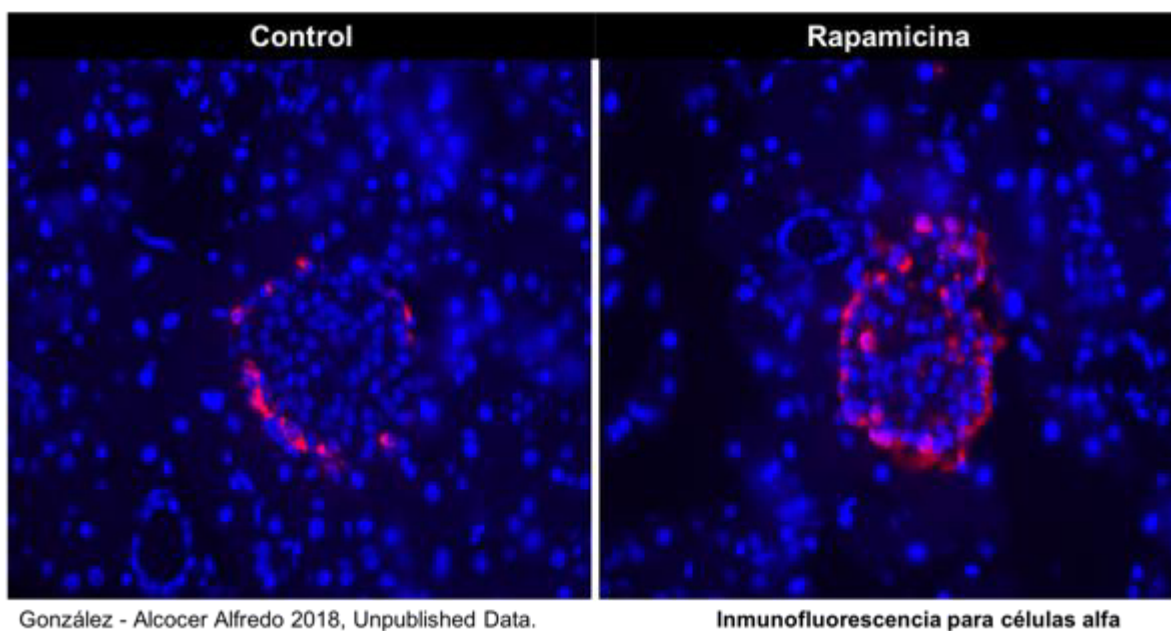
González - Alcocer Alfredo 2018, Unpublished Data.

IHQ/IF para células beta

**Fig. 11. La rapamicina altera la organización celular del islote de Langerhans. A)** Inmunohistoquímica y **B)** inmunofluorescencia para identificar la población de células-beta con un anticuerpo específico anti-insulina. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al grupo control, en donde se observa la distribución normal de las células-beta, las cuales se distribuyen solamente en el interior del islote de Langerhans (**línea punteada amarilla**). En el grupo tratado con rapamicina (lado derecho) se observó una distribución anormal de las células-beta, tanto en el interior

como en la periferia del islote de Langerhans. En la figura **B)** se repite el mismo resultado que la técnica de IHC, en donde el grupo control solamente presenta señal positiva para células beta en el interior del islote, lo que no se aprecie en el grupo rapamicina, ya que hay una señal positiva uniforme en todo el islote. El fluorocromo azul DAPI se utilizó para observar el núcleo en **B)**.

Por consiguiente, evaluamos si la población de células-alfa productoras de glucagón también estaba siendo alterada, por lo que se llevó a cabo una inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para células alfa (**Fig 12**). Con ello, logramos determinar que en el grupo tratado con rapamicina había una alteración en la distribución de las células-alfa, que como ya se mencionó, en el control se encuentran normalmente localizadas en la periferia del islote de Langerhans, y en este caso se observan claramente en el interior del mismo.





**Fig. 12. La rapamicina altera la distribución las células-alfa del islote de Langerhans.** Inmunofluorescencia para identificar la población de células-alfa con un anticuerpo específico anti-glucagón. En el grupo control se observa la organización normal de las células-alfa, las cuales se distribuyen solamente en la periferia del islote de Langerhans (**células color rojo**). El grupo tratado con rapamicina presenta una alteración de esta distribución, ya que las células positivas para células alfa, no solamente se localizan en la periferia del islote de Langerhans sino también en el interior del mismo.

Tras los análisis efectuados, pudimos concluir que la rapamicina altera la histología del páncreas a nivel de la distribución de las fibras de colágeno, causa una dilatación de los capilares ubicados en el interior del islote pancreático, así como una alteración de la distribución de las células-alfa y -beta del islote de Langerhans.

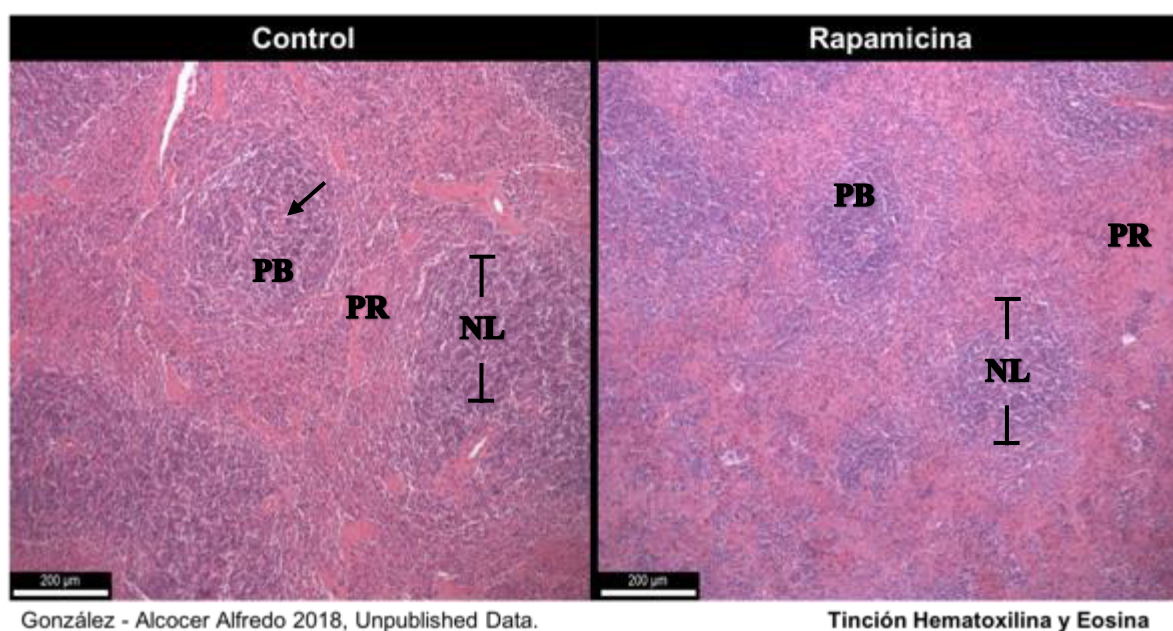
#### **3.1.1.4 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no causa cambios morfológicos en bazo**

Una de las propiedades de la rapamicina es que como agente inmunosupresor tiene la capacidad de inhibir la proliferación y diferenciación de células T, células B, así como células presentadoras de antígenos [48]. Por lo que se evaluó si la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina causaba cambios a nivel histológico de un órgano linfoide como el bazo.

Se realizó la tinción con HyE en cortes histológicos de bazo, el cual podemos dividir en:

a) pulpa blanca, la cual está compuesta por una gran acumulación de linfocitos T

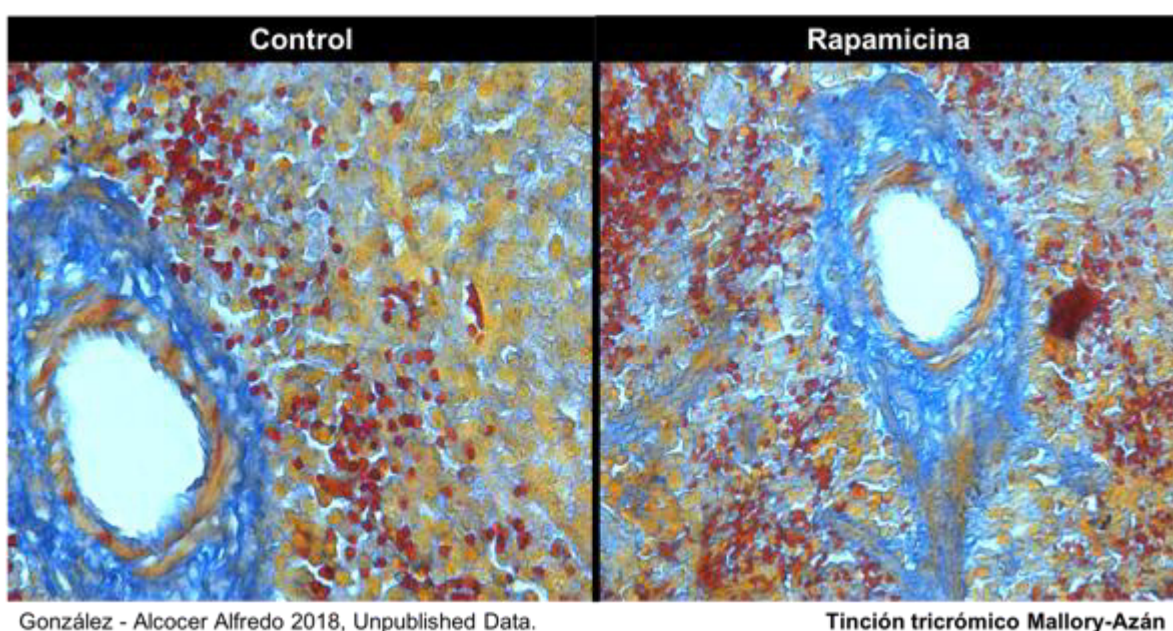
alrededor de una arteria o arteriola y forma la vaina linfática periarteriolar (“PALS”, por sus siglas en inglés), así como por nódulos linfáticos con centros germinativos, en donde proliferan los linfocitos B; y b) pulpa roja, compuesta por cordones esplénicos y sinusoides. Los sinusoides están formados por células endoteliales alargadas y discontinuas, rodeadas por una membrana basal engrosada dispuesta a manera de anillos, en asociación con fibras reticulares. Se analizó la histología del grupo control, así como del grupo tratado con rapamicina. Ambos grupos presentaron una histología normal como la anteriormente descrita (**Fig. 13**).



**Fig. 13.** La rapamicina no altera la histología del bazo. La imagen del lado izquierdo corresponde al grupo control tratado con PBS 1X, en donde se observa la pulpa blanca (**PB**) y pulpa roja (**PR**), ambas con una histología normal, por otra parte en el grupo tratado con la rapamicina, se observa la misma histología sin cambios. Nódulo

linfático (NL), la flecha indica una arteriola central. Microfotografías de bazo 100X, tinción con HyE.

Asimismo, se evaluó la organización de las fibras de colágeno mediante la tinción de tricrómico Mallory-Azán, en donde no se observó alteración alguna en respuesta a la rapamicina en comparación con el grupo control (**Fig. 14**).



**Fig. 14.** La rapamicina no altera la distribución de las fibras de colágeno en **bazo**. Se observa la presencia de fibras de colágeno de color azul con una organización normal, dispuestas alrededor de una arteria. Microfotografías de bazo 400X, tinción con tricrómico Mallory-Azán.

Por lo que pudimos concluir que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina no causa alteraciones en la histología del bazo que es un órgano linfoide.

### **3.1.2 Evaluación del posible efecto inmunosupresor de la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo***

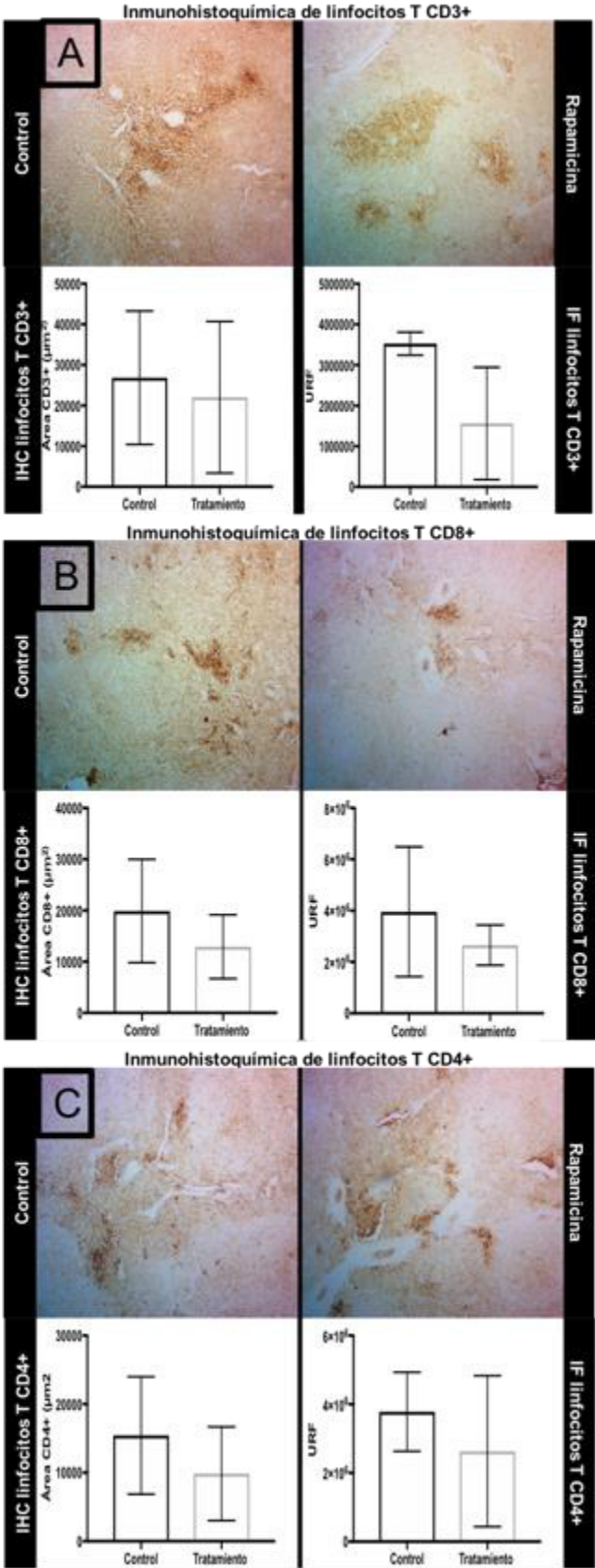
Aunque no se observaron alteraciones en el bazo a nivel histológico en respuesta a la rapamicina, quisimos evaluar de manera específica si la dosis neuroprotectora de la rapamicina ejercía algún efecto inmunosupresor sobre las poblaciones celulares del sistema inmune como: linfocitos T CD3+, linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos T cooperadores CD4+, linfocitos B CD 20+, y macrófagos CD68+ pertenecientes a la población de células presentadoras de antígenos.

#### **3.1.2.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no altera la población de linfocitos T CD3+, citotóxicos CD8+, ni cooperadores CD4+ en bazo**

Los linfocitos T CD3+ tienen la capacidad de diferenciarse a linfocitos citotóxicos CD8+, así como a linfocitos cooperadores CD4+. Por lo que la rapamicina podría representar una adversidad. Para determinar si la rapamicina aún a dosis neuroprotectoras tenía un efecto inhibitorio sobre la diferenciación y proliferación de los linfocitos T, se llevó acabo la inmunodetección de dichas poblaciones celulares con anticuerpos específicos.

Demostramos que la rapamicina no altera los niveles de linfocitos T CD3+ (**Fig. 15A**), CD8+ (**Fig. 15B**) y CD4+ (**Fig. 15C**) mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, lo cual corroboramos a través de morfometrías, en donde se

evaluó el área positiva para cada marcador de linfocitos, así como la intensidad de la fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia, URF). Corroboramos que la rapamicina no causa cambios estadísticamente significativos en la población de linfocitos T CD3+, CD4+, y CD8+ en comparación con el grupo control (**Fig. 15**).



González - Alcocer Alfredo 2018, Unpublished Data.

**Fig. 15. La rapamicina no altera la población de linfocitos T residentes del bazo.** Inmunohistoquímica para la detección de linfocitos T A) CD3+, B) CD8+ y C) CD4+. Se muestra el análisis morfométrico del área positiva para la respectiva inmunodetección, así como las unidades relativas de fluorescencia (URF) obtenidas por inmunofluorescencia. En las tres poblaciones analizadas no se encontró diferencia estadísticamente significativa en respuesta a la rapamicina en comparación con el grupo control.

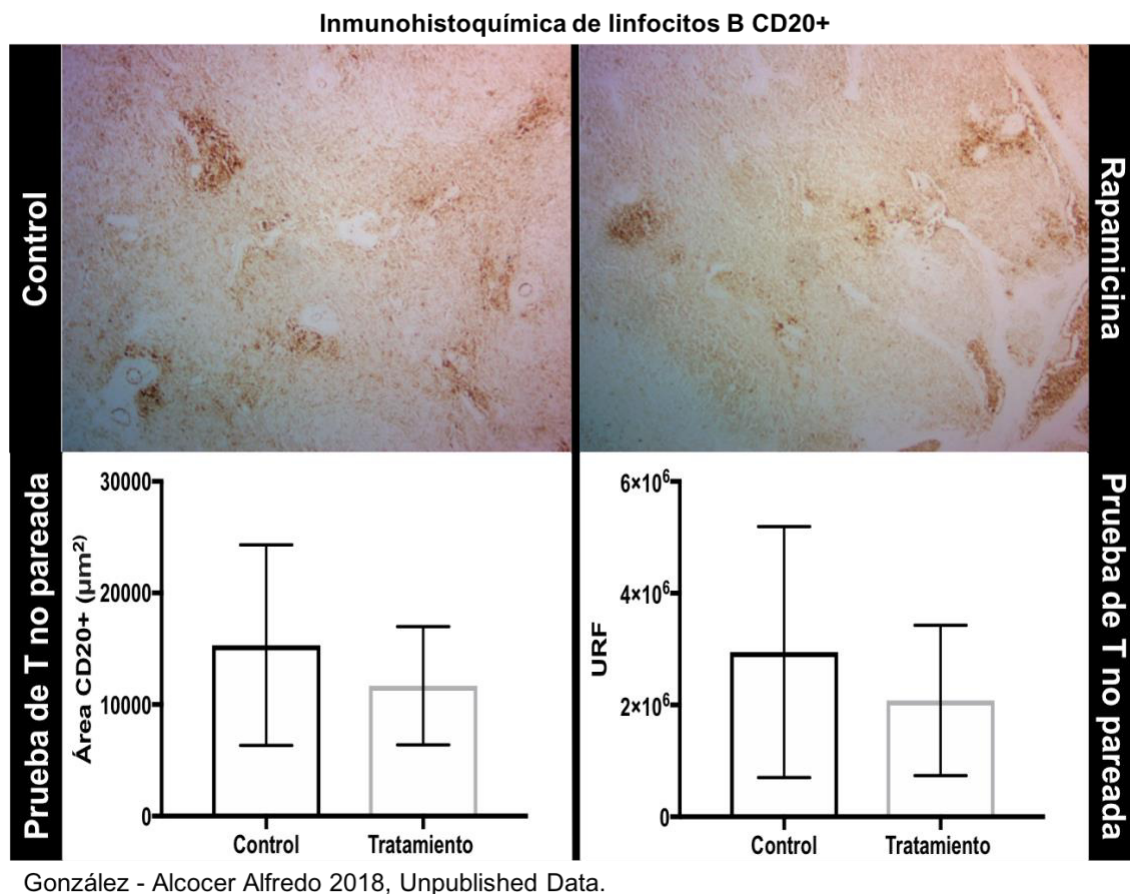
Por lo tanto, la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina no causa alteraciones en las distintas poblaciones de linfocitos T en el bazo.

### **3.1.2.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no modifica la población de linfocitos B CD20+ en bazo**

Otro de los blancos terapéuticos de la rapamicina como agente inmunosupresor son los linfocitos B. Para determinar si una dosis neuroprotectora de la rapamicina tenía un efecto inhibitorio sobre la diferenciación y proliferación de los linfocitos B, se llevó a cabo la inmunodetección con un anticuerpo específico contra el marcador de linfocitos B CD20+.

Demostramos que la rapamicina no causa cambios estadísticamente significativos en la población de linfocitos B en el bazo en comparación con el grupo control, lo cual corroboramos mediante morfometrías evaluando el área positiva para el marcador CD20+, así como a través de la obtención de las URF (**Fig. 16**).





**Fig. 16. La rapamicina no altera la población de linfocitos B CD20+ del bazo.**

Inmunohistoquímica para la detección de linfocitos B CD20+. Se muestra el análisis morfométrico del área positiva para la inmunodetección con un anticuerpo específico anti-CD20+, así como las unidades relativas de fluorescencia (URF) obtenidas por inmunofluorescencia. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en respuesta a la rapamicina en comparación con el grupo control.

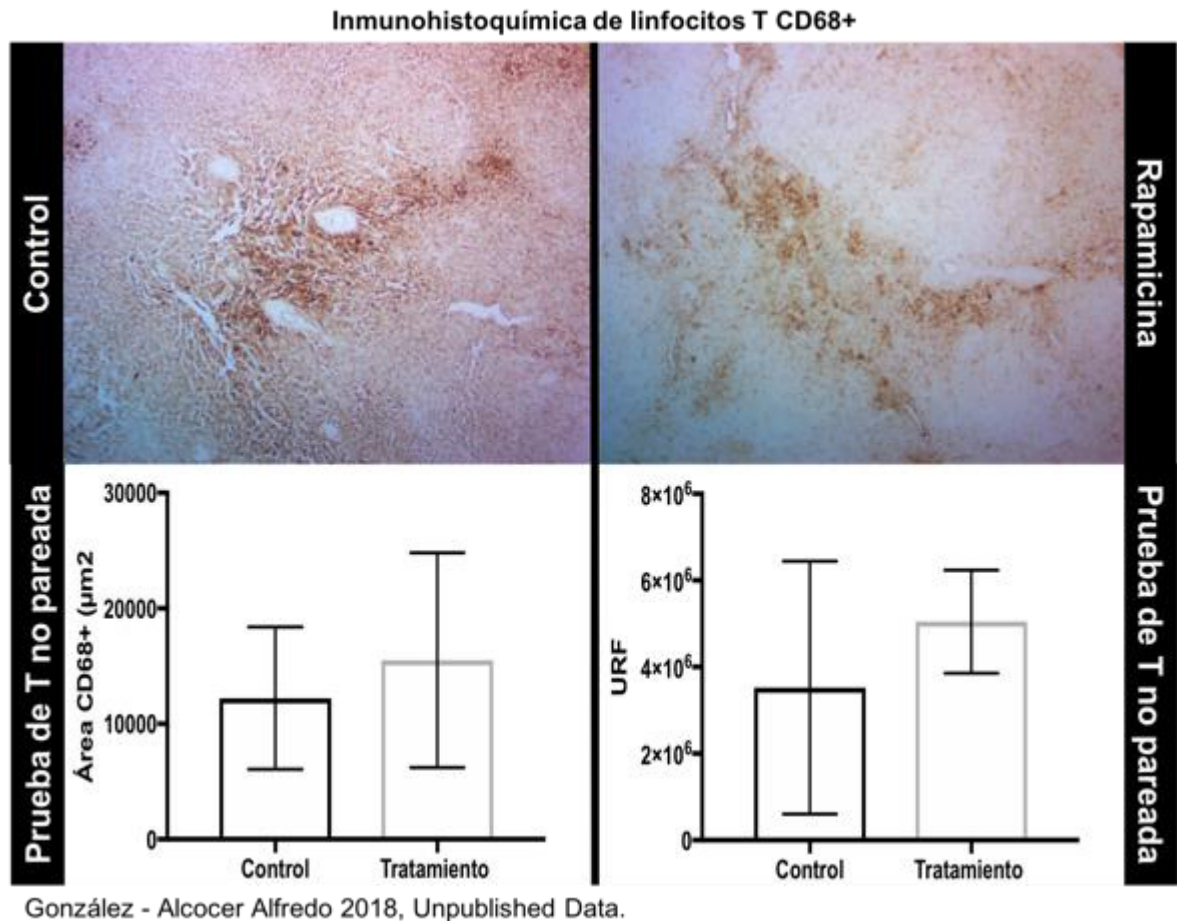
Tras realizar los análisis antes mencionados, se pudo concluir que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina no causa alteraciones en la población de linfocitos B CD20+ en el bazo.



### **3.1.2.3 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no afecta la población de células presentadoras de antígenos: macrófagos CD68+**

Como se mencionó anteriormente, la rapamicina, como agente inmunosupresor, también tiene la capacidad de inhibir la proliferación y diferenciación de células presentadoras de antígenos, como los macrófagos CD68+.

Se evaluó si la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina generaba alguna alteración en la población de macrófagos CD68+, mediante inmunodetección. Observamos que la rapamicina no causa cambios estadísticamente significativos en el grupo tratado con rapamicina en comparación con el grupo control. Estos resultados fueron corroborados por morfometrías evaluando el área positiva para el marcador CD68+, así como a través de la obtención de las URF (**Fig. 17**).



**Fig. 17. La rapamicina no altera la población de macrófagos CD68+ residentes del bazo.** Inmunohistoquímica para la detección de macrófagos CD68+. Se muestra el análisis morfométrico del área positiva para macrófagos CD68+, así como las unidades relativas de fluorescencia (URF) obtenidas por inmunofluorescencia. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en respuesta a la rapamicina en comparación con el grupo control.

Por lo que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina no causa alteraciones en la población de macrófagos CD68+ residentes del bazo.

### **3.1.3 Determinación del efecto neuroprotector de la rapamicina sobre la vía de la autofagia en un modelo *in vivo***

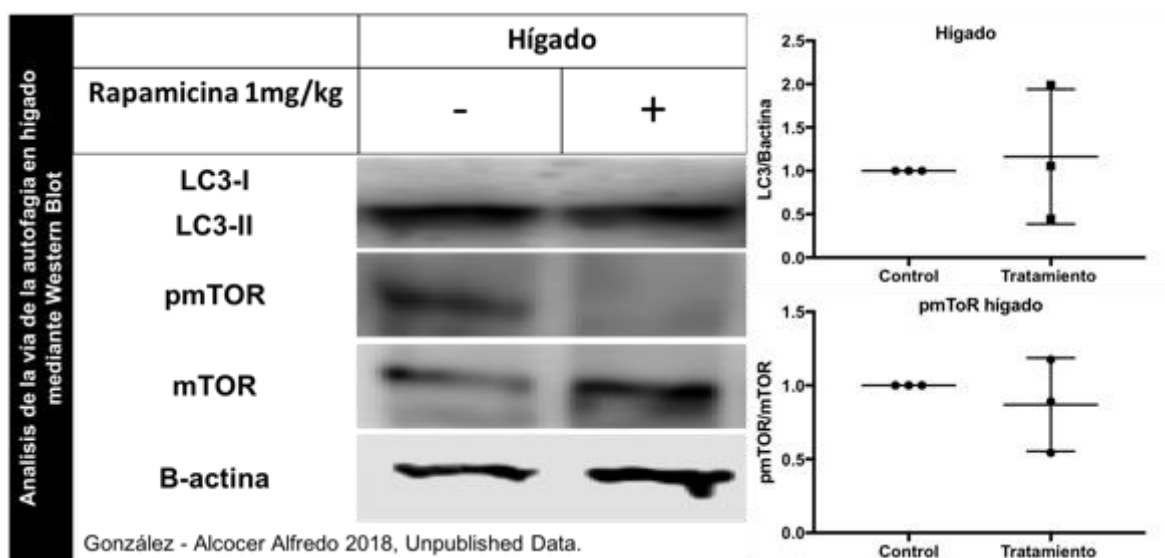
El efecto neuroprotector inducido por la rapamicina se debe a su efecto como inductor de la autofagia, a través de la inhibición de mTOR, que a su vez es un regulador negativo de la autofagia [67]. Por lo que fue de gran importancia evaluar la interacción de estas vías en los órganos donde vimos cambios histológicos como hígado y páncreas.

#### **3.1.3.1 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* altera la vía de la autofagia en el hígado**

La autofagia es un mecanismo intracelular activado bajo el estímulo de diversos factores, y puede monitorearse mediante el análisis de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos, por sus siglas en inglés “LC3”, que nos indica los niveles de la autofagia. La molécula LC3-I (citósólica) es modificada por el sistema de ubiquitina a su forma lipidada, LC3-II (ligada a las estructuras de la membrana, incluyendo el fagóforo, autofagosoma y autofagolisosoma). Esta isoforma se ancla a la membrana externa e interna del autofagosoma [68]. Mediante WB podemos analizar la activación de la vía de la autofagia mediante la conversión de LC3-I a LC3-II, lo que nos indica la abundancia de estructuras relacionadas con la autofagia (, autofagosomas y autofagolisosomas) [69]. La forma activa de la proteína mTOR es cuando se encuentra fosforilada y de esta manera se inhibe la autofagia, mientras que la rapamicina inhibe la activación de mTOR y por consecuencia se activa la autofagia.

Por lo que evaluamos el estatus de LC3-II y mTOR para relacionar las alteraciones observadas en el hígado con el efecto inductor de autofagia de la rapamicina.

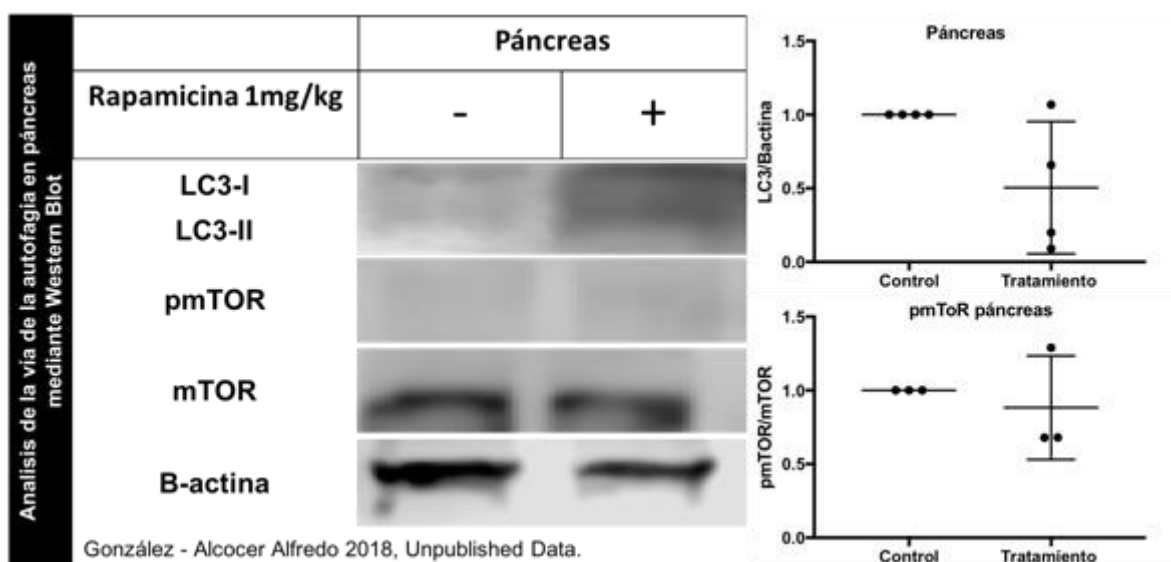
En el hígado no se observó diferencia en los niveles de LC3-II en respuesta a la rapamicina en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el grupo tratado con rapamicina hubo una disminución importante de la fosforilación de mTOR (pmTOR) en comparación al grupo control, lo cual es consistente con el efecto de la rapamicina como inductor de autofagia y con la presencia de los cuerpos vesiculados observados en dicho órgano (tinción con HyE) (**Fig. 18**).



**Fig. 18. La rapamicina induce la vía de la autofagia en hígado.** Extractos de proteína se obtuvieron a partir de hígado. Se realizó la detección de las proteínas LC3-II, pmTOR, mTOR y B-actina con anticuerpos específicos mediante WB. A la derecha se muestran los análisis de densitometría de LC3-II y pmTOR.

### 3.1.3.2 La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* altera la vía de la autofagia en el páncreas

En el páncreas se observó un aumento en los niveles de LC3-II en el grupo tratado con rapamicina, pero no se encontró fosforilación de mTOR (pmTOR) (**Fig. 19**). Por lo que es necesario realizar estudios más a fondo para determinar si la autofagia inducida por rapamicina en el páncreas es independiente de mTOR.



**Fig. 19.** La rapamicina induce la vía de la autofagia en páncreas. Extractos de proteína se obtuvieron a partir de páncreas. Se realizó la detección de las proteínas LC3-II, pmTOR, mTOR y B-actina con anticuerpos específicos mediante WB. A la derecha se muestran los análisis de densitometría de LC3-II y pmTOR.

Con esto pudimos concluir que la rapamicina empleada a una dosis neuroprotectora, induce la vía de la autofagia en el hígado, inhibiendo la fosforilación de mTOR de una manera significativa., mientras que en el páncreas se observó un incremento de LC3-II.

## Capítulo 4

### 4.1 Discusión

En este estudio se describe por primera vez el efecto de la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina [59] sobre la morfología de órganos blanco como el hígado, riñón, páncreas y bazo. En la literatura no existen estudios que hayan evaluado la histología de estos órganos en respuesta a la administración de un esquema terapéutico de rapamicina.

En el riñón observamos que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo* no causó cambios a nivel histológico. Un estudio previo reportó el uso de la rapamicina en un modelo de disfunción crónica de aloinjerto renal en ratas, en donde fue capaz de reducir el daño tubulointersticial, la glomeruloesclerosis, la acumulación de leucocitos y la vasculopatía que se produjeron en respuesta al aloinjerto, pero no la proteinuria, cabe señalar que su esquema terapéutico fue la administración diaria de 1mg/kg de rapamicina durante 24 semanas, a diferencia de nuestro esquema neuroprotector por 7 semanas [70]. Estudios en modelos animales que emplearon la rapamicina, indicaran que la inhibición de la vía de mTOR tiene efectos benéficos contra patologías como la enfermedad glomerular, enfermedad del riñón poliquístico, y el

cáncer renal. Sin embargo, aún existen discrepancias con respecto a la experiencia clínica con pacientes [71]. Inclusive la rapamicina tuvo efectos benéficos sobre los efectos adversos producidos en el riñón por el uso de la gentamicina [72]. Por último, en relación con el riñón, hay evidencia que indica que la activación de la vía de autofagia, en un modelo de daño renal agudo inducido por endotoxinas, tiene un efecto protector de los túbulos renales [73]. Por lo que podemos resumir que, en respuesta a alteraciones renales, la rapamicina ha demostrado un tener un efecto benéfico. Sin embargo, ningún estudio demuestra el efecto de la rapamicina en un modelo silvestre. Por lo que nuestro estudio proporciona un gran aporte en el área de investigación.

En el hígado identificamos la presencia de hepatocitos con aspecto vesiculado, así como la dilatación de los sinusoides hepáticos. Estos resultados se relacionan con la inhibición de mTORC1 por tiempos prolongados, en donde ocurre daño hepático, inflamación y tumorigénesis [74]. La dilatación de los sinusoides hepáticos puede deberse a cambios en las células hepáticas, alteraciones hemodinámicas o factores solubles sistémicos como la interleucina 6 (IL-6), la vía de Notch-1 o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [75]. . Mediante el análisis por WB, demostramos que la administración crónica de una dosis de rapamicina *in vivo* disminuye la activación de mTOR. Esto se ha reportado previamente, en donde la rapamicina, en efecto, inhibe la activación de mTOR mediante la inhibición de su fosforilación [77].

En relación al páncreas, se ha demostrado que la vía mTOR es crítica para el crecimiento de las células pancreáticas, por lo que la inactivación de mTOR y su molécula “río abajo”, raptor, causa alteraciones en el crecimiento que pueden causar



agenesia o hipoplasia pancreática [78]. En nuestro estudio, encontramos que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de la rapamicina induce la alteración de la organización de las células-alfa y -beta. Estos resultados son consistentes con estudios recientes, en donde demostraron que mTORC1 regula la proliferación y maduración de las células-alfa y -beta, y que la administración crónica de rapamicina disminuye la síntesis y secreción de glucagón e insulina, respectivamente [66], [79], [80]. Por otro lado, nuestros resultados contrastan con estudios en donde la rapamicina ha demostrado tener efectos benéficos previniendo la resistencia a insulina causada por hiperinsulinemia crónica en hígado y músculo a través de la inhibición de mTOR [81], [82].

Al inicio de la década pasada, aproximadamente el 20% de los pacientes con trasplante de páncreas fueron tratados con inmunosupresores como la rapamicina para evitar el rechazo del órgano, y actualmente sólo el 10% de los pacientes con trasplantes sigue utilizándolos debido a los efectos secundarios que induce [83]. En nuestro estudio, utilizamos la rapamicina a una dosis 50 veces menor a la empleada en esquemas terapéuticos post-trasplante, la cual hemos determinado previamente que ejerce un efecto neuroprotector en un modelo de la EP [59]. Dentro de nuestros hallazgos encontramos una alteración en la organización de las células-alfa y -beta de los islotes de Langerhans, lo cual sugiere que la rapamicina empleada a dosis inmunosupresoras podría causar un daño mucho mayor sobre los islotes pancreáticos. Por lo que es necesario realizar estudios a largo plazo para asegurar el uso de la rapamicina en diversas patologías en pacientes.

mTOR tiene un papel fundamental en la homeostasis y función de las células del sistema inmune, ya que la inhibición de mTOR resulta en alteraciones en el tamaño de las células, el desarrollo de células del sistema inmune, y la producción de anticuerpos [84]. Por lo que analizamos el bazo, que es un órgano linfoide secundario. Demostramos que la administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina, que como se mencionó equivale a una dosis 50 veces menor a la empleada como inmunosupresor, no causa alteraciones en la histología esplénica. En otros estudios se ha reportado el uso terapéutico de la rapamicina durante tiempos prolongados, dosis diarias, y elevadas, que como consecuencia causa efectos adversos sobre la función de mTOR [85].

mTOR es un sensor e integrador de señales del microambiente inmunitario, por lo que tiene una influencia sobre la diferenciación y maduración de células T, células B, así como células presentadoras de antígenos [48], [86]. Demostramos que la dosis de rapamicina empleada en nuestro estudio no afecta a las poblaciones de células T CD3+, CD8+, y CD4+ .

Reportes indican que la molécula fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) es blanco de mTOR, y necesaria para la proliferación de las células B [87], por lo que la inhibición de la vía de mTOR afecta la proliferación de células B, lo cual no sucedió en nuestro estudio, por lo que nuestro esquema de tratamiento con rapamicina no afecta la población de linfocitos B CD20+.

Además, se ha reportado que mTOR regula la respuesta de células presentadoras de antígenos en respuesta a estímulos inflamatorios [88]. De manera contradictoria, se ha

encontrado, que la inhibición de mTOR genera un aumento de las células dendríticas [89]. En nuestros resultados, la rapamicina no muestra una diferencia estadísticamente significativa en la población de macrófagos en comparación con el grupo control. No obstante, se ha reportado que el uso de la rapamicina como potenciador de la respuesta inmune, deteriora la acidificación de las vesículas fagocíticas de los macrófagos [90], por lo que sería importante evaluar la funcionalidad de los macrófagos.

Cabe destacar, que los resultados obtenidos en el presente estudio, en gran parte difieren de los resultados reportados en la literatura, principalmente por la diferencia de las dosis y períodos de administración, y se relacionan con el reporte de un tratamiento intermitente con rapamicina, que puede disminuir sus efectos adversos sobre el sistema inmune [77].

Nuestros hallazgos, son importantes en el establecimiento de tratamientos preventivos de enfermedades neurodegenerativas, como la EP, ya que éstas son de lenta y progresiva evolución. Hemos demostrado que una dosis de rapamicina, que es 50 veces menor a la usada como inmunosupresor, en un modelo murino, tiene un papel neuroprotector, sin embargo, indujo alteración en la organización de los islotes pancreáticos, por lo que se requieren estudios a largo plazo para determinar si este efecto es significativo y pueda repercutir en la homeostasis de la glucosa sanguínea. Por otro lado, lo más destacado es que no afecta al sistema inmunitario. De esta manera, podemos determinar que esta dosis de rapamicina no tiene el efecto inmunosupresor descrito anteriormente. Por lo tanto, la rapamicina es un buen candidato para el tratamiento de estas enfermedades.

## Capítulo 5

### 5.1 Conclusiones

La administración crónica de una dosis neuroprotectora de rapamicina *in vivo*:

- 5.1.1** No altera el peso corporal.
- 5.1.2** Causa una dilatación de los sinusoides hepáticos, así como la presencia de hepatocitos con citoplasma de aspecto vesiculado en el hígado.
- 5.1.3** No causa cambios morfológicos en el riñón.
- 5.1.4** Causa una dilatación de los capilares de los islotes de Langerhans, así como una invasión por las fibras de colágena del tabique hacia el páncreas exocrino.
- 5.1.5** Altera la organización de las células-alfa y -beta de los islotes de Langerhans en el páncreas.
- 5.1.6** No causa cambios morfológicos en el bazo.
- 5.1.7** No altera la población de linfocitos T CD3+, CD4+, y CD8+.
- 5.1.8** No altera la población de linfocitos B CD20+.
- 5.1.9** No altera la población de macrófagos CD68+.
- 5.1.10** Inhibe la fosforilación de mTOR en el hígado.
- 5.1.11** Induce un incremento del marcador de autofagia LC3-II en el páncreas.

### Literatura Citada

1. Ahmed, A., & Tollefsbol, T. (2001). Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 49(8), 1105-1109.
2. Busse, E. W. (1987). Hypochondriasis in the elderly. *Comprehensive therapy*, 13(5), 37-42.
3. Sahin, E., & DePinho, R. A. (2010). Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*, 464(7288), 520.
4. Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H., & Franco, R. (2012). Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*, 17(12), 1764-1784.
5. Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nature medicine*, 10(7), S18.
6. Shetty, A. K., Hattiangady, B., Rao, M. S., & Shuai, B. (2011). Deafferentation enhances neurogenesis in the young and middle aged hippocampus but not in the aged hippocampus. *Hippocampus*, 21(6), 631-646.
7. Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529.
8. van Ham, T. J., Breitling, R., Swertz, M. A., & Nollen, E. A. (2009). Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO molecular medicine*, 1(8-9), 360-370.
9. Durham, H. D., Roy, J., Dong, L., & Figlewicz, D. A. (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(5), 523-530.

10. Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., ... & Wanker, E. E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90(3), 549-558.
11. Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology*, 14(2), 70-77.
12. Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), 463-477.
13. Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995.
14. Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 118(1), 7-18.
15. Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(11), 931.
16. Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 19-40.
17. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
18. Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
19. Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2011). DNA damage and autophagy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 158-166.
20. Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death and differentiation*, 12(S2), 1535.

21. Kesidou, E., Lagoudaki, R., Touloumi, O., Poulatsidou, K. N., & Simeonidou, C. (2013). Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural regeneration research*, 8(24), 2275.
22. Millecamps, S., & Julien, J. P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(3), 161.
23. Nah, J., Pyo, J. O., Jung, S., Yoo, S. M., Kam, T. I., Chang, J., ... & Jung, Y. K. (2013). BECN1/Beclin 1 is recruited into lipid rafts by prion to activate autophagy in response to amyloid  $\beta$  42. *autophagy*, 9(12), 2009-2021.
24. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(7), 458.
25. Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42.
26. Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545.
27. Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*, 9(10), 1102.
28. Dumont, F. J., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Melino, M. R., & Sigal, N. H. (1990). Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *The Journal of Immunology*, 144(1), 251-258.
29. Singh, K., Sun, S., & Vezina, C. (1979). Rapamycin (AY-22, 989), A New Antifungal Antibiotic. *The Journal of antibiotics*, 32(6), 630-645.
30. Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., NISHIYAMA, M., YAJIMA, T., ... & OCHIAI, T. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces.

- II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of antibiotics*, 40(9), 1256-1265.
31. Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1992). Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 3686-3690.
  32. O'Keefe, S. J., Tamura, J. I., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., & O'Neill, E. A. (1992). FK-506-and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*, 357(6380), 692.
  33. Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287-1295.
  34. Heitman, J. (2015). On the discovery of TOR as the target of rapamycin. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005245.
  35. Bastidas, R. J., Shertz, C. A., Lee, S. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2011). Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryotic cell*, EC-05284.
  36. Vezina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. *The Journal of antibiotics*, 28(10), 721-726.
  37. Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38, 768–774.
  38. Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2016). The mechanistic target of rapamycin: the grand conductTOR of metabolism and aging. *Cell metabolism*, 23(6), 990-1003.



39. Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192(2), 245-250.
40. Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology*, 150(6), 1507-1513.
41. Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3963-3966.
42. Straub, M., Bredschneider, M., & Thumm, M. (1997). AUT3, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 179(12), 3875-3883.
43. Crino, P. B. (2016). The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 12(7), 379.
44. Bockaert, J., & Marin, P. (2015). mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiological reviews*, 95(4), 1157-1187.
45. Crino, P. B. (2015). mTOR signaling in epilepsy: insights from malformations of cortical development. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(4), a022442.
46. B Jahrling, J., & Laberge, R. M. (2015). Age-related neurodegeneration prevention through mTOR inhibition: potential mechanisms and remaining questions. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(21), 2139-2151.
47. Martel, R. R., Klicius, J., & Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 55(1), 48-51.

48. Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology*, 30, 39-68.
49. Lamming, D. W., & Sabatini, D. M. (2010). Regulation of TOR signaling in mammals. In *The Enzymes* (Vol. 27, pp. 21-38). Academic Press.
50. Houchens, D. P., Ovejera, A. A., Riblet, S. M., & Slagel, D. E. (1983). Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19(6), 799-805.
51. Eng, C. P., Sehgal, S. N., & Vézina, C. (1984). Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics*, 37(10), 1231-1237.
52. Zarin, D. A., Tse, T., Williams, R. J., Califf, R. M., & Ide, N. C. (2011). The ClinicalTrials.gov results database—update and key issues. *New England Journal of Medicine*, 364(9), 852-860.
53. Bové, J., Martínez-Vicente, M., & Vila, M. (2011). Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8), 437.
54. Kaeberlein, M., Powers, R. W., Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., ... & Kennedy, B. K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751), 1193-1196.
55. Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L., & Müller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, 426(6967), 620.
56. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., ... & Pahor, M. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *nature*, 460(7253), 392.
57. Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 13(7), 805.

58. Pan, T., Kondo, S., Zhu, W., Xie, W., Jankovic, J., & Le, W. (2008). Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiology of disease*, 32(1), 16-25.
59. Ramírez-Moreno, Marcela. (2016). Análisis del efecto de la inducción de autofagia en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
60. Massey, A. C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., & Cuervo, A. M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5805-5810.
61. Ekberg, H., Bernasconi, C., Nöldeke, J., Yussim, A., Mjörnstedt, L., Erken, U., ... & Navrátil, P. (2010). Cyclosporine, tacrolimus and sirolimus retain their distinct toxicity profiles despite low doses in the Symphony study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(6), 2004-2010.
62. Avellino, R., Romano, S., Parasole, R., Bisogni, R., Lamberti, A., Poggi, V., ... & Romano, M. F. (2005). Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, 106(4), 1400-1406.
63. Tirado, O. M., Mateo-Lozano, S., & Notario, V. (2005). Rapamycin induces apoptosis of JN-DSRCT-1 cells by increasing the Bax: Bcl-xL ratio through concurrent mechanisms dependent and independent of its mTOR inhibitory activity. *Oncogene*, 24(20), 3348.
64. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(5), pdb-prot4986.

65. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histology: Interactive Atlas to Accompany Histology: a Text and Atlas; with Correlated Cell and Molecular Biology*. CD-ROM. Lippincott, Williams & Wilkins.
66. Barlow, A. D., Nicholson, M. L., & Herbert, T. P. (2013). Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic  $\beta$ -cells and a review of the underlying molecular mechanisms. *Diabetes*, 62(8), 2674-2682.
67. Lamming, D. W. (2016). Inhibition of the mechanistic target of rapamycin (mTOR)—rapamycin and beyond. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, a025924.
68. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326.
69. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., ... & Adhihetty, P. J. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 12(1), 1-222.
70. Ko, H. T., Yin, J. L., Wyburn, K., Wu, H., Eris, J. M., Hambly, B. D., & Chadban, S. J. (2012). Sirolimus reduces vasculopathy but exacerbates proteinuria in association with inhibition of VEGF and VEGFR in a rat kidney model of chronic allograft dysfunction. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(2), 327-336.
71. Huber, T. B., Walz, G., & Kuehn, E. W. (2011). mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney international*, 79(5), 502-511.
72. Cui, J., Bai, X. Y., Sun, X., Cai, G., Hong, Q., Ding, R., & Chen, X. (2015). Rapamycin protects against gentamicin-induced acute kidney injury via autophagy in mini-pig models. *Scientific reports*, 5, 11256.

73. Mei, S., Livingston, M., Hao, J., Mei, C., & Dong, Z. (2016). Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury. *Scientific reports*, 6, 22171.
74. Umemura, A., Park, E. J., Taniguchi, K., Lee, J. H., Shalapour, S., Valasek, M. A., ... & Karin, M. (2014). Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell metabolism*, 20(1), 133-144.
75. Marzano, C., Cazals-Hatem, D., Rautou, P. E., & Valla, D. C. (2015). The significance of nonobstructive sinusoidal dilatation of the liver: Impaired portal perfusion or inflammatory reaction syndrome. *Hepatology*, 62(3), 956-963.
76. Zhang, Y., He, X., Wu, X., Lei, M., Wei, Z., Zhang, X., ... & Qu, S. (2017). Rapamycin upregulates glutamate transporter and IL-6 expression in astrocytes in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell death & disease*, 8(2), e2611.
77. Arriola Apelo, S. I., & Lamming, D. W. (2016). Rapamycin: an inhibiTOR of aging emerges from the soil of Easter Island. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 71(7), 841-849.
78. Elghazi, L., Blandino-Rosano, M., Alejandro, E., Cras-Méneur, C., & Bernal-Mizrachi, E. (2017). Role of nutrients and mTOR signaling in the regulation of pancreatic progenitors development. *Molecular metabolism*, 6(6), 560-573.
79. Bozadjieva, N., Blandino-Rosano, M., Chase, J., Dai, X. Q., Cummings, K., Gimeno, J., ... & Hall, M. N. (2017). Loss of mTORC1 signaling alters pancreatic  $\alpha$  cell mass and impairs glucagon secretion. *The Journal of clinical investigation*, 127(12), 4379-4393.
80. Blandino-Rosano, M., Barbaresso, R., Jimenez-Palomares, M., Bozadjieva, N., Werneck-de-Castro, J. P., Hatanaka, M., ... & Hall, M. N. (2017). Loss of mTORC1 signalling impairs  $\beta$ -cell homeostasis and insulin processing. *Nature communications*, 8, 16014.

81. Ueno, M., Carvalheira, J. B. C., Tambascia, R. C., Bezerra, R. M. N., Amaral, M. E., Carneiro, E. M., ... & Saad, M. J. A. (2005). Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia*, 48(3), 506-518.
82. Tremblay, F., & Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38052-38060.
83. Berney, T., Andres, A., Toso, C., Majno, P., & Squifflet, J. P. (2018). mTOR inhibition and clinical transplantation: pancreas and islet. *Transplantation*, 102(2S), S30-S31.
84. Zhang, S., Readinger, J. A., DuBois, W., Janka-Junttila, M., Robinson, R., Pruitt, M., ... & Parent, C. A. (2010). Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production. *Blood*, blood-2010.
85. Umemura, A., Park, E. J., Taniguchi, K., Lee, J. H., Shalapour, S., Valasek, M. A., ... & Karin, M. (2014). Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell metabolism*, 20(1), 133-144.
86. Powell, J. D., & Delgoffe, G. M. (2010). The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity*, 33(3), 301-311.
87. Donahue, A. C., & Fruman, D. A. (2003). Proliferation and survival of activated B cells requires sustained antigen receptor engagement and phosphoinositide 3-kinase activation. *The Journal of Immunology*, 170(12), 5851-5860.
88. Thomson, A. W., Turnquist, H. R., & Raimondi, G. (2009). Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 324.

89. Scheffler, J. M., Sparber, F., Tripp, C. H., Herrmann, C., Humenberger, A., Blitz, J., ... & Huber, L. A. (2014). LAMTOR2 regulates dendritic cell homeostasis through FLT3-dependent mTOR signalling. *Nature communications*, 5, 5138.
90. Goldberg, E. L., Smithey, M. J., Lutes, L. K., Uhrlaub, J. L., & Nikolich-Žugich, J. (2014). Immune Memory–Boosting Dose of Rapamycin Impairs Macrophage Vesicle Acidification and Curtails Glycolysis in Effector CD8 Cells, Impairing Defense against Acute Infections. *The Journal of Immunology*, 1400188.